



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2018

**KARLA VERCESIDE  
QUEIRÓZ**

**OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO LABORATORIAL DE  
CAMARÕES PALAEMONÍDEOS PARA AVALIAÇÃO  
DA PLASTICIDADE TRÓFICA E FENOTÍPICA**





**KARLA VERCESIDE  
QUEIRÓZ**

**OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO LABORATORIAL DE  
CAMARÕES PALAEMONÍDEOS PARA AVALIAÇÃO  
DA PLASTICIDADE TRÓFICA E FENOTÍPICA**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia e ecologia das Alterações Globais, realizada sob a orientação científica do Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado, Investigador principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a coorientação da Doutora Liliam de Arruda Hayd, Professora adjunta da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e do Doutor Fernando António Francisco Ricardo, Investigador Pós – Doc da Universidade de Aveiro.



Apoio financeiro da UEMS e FUNDECT – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, respectivamente, por meio da atribuição da bolsa de Doutorado e auxílio a pesquisa com referência 23/200.755/2014.



Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Maria, à minha irmã Elisa e ao meu companheiro Felipe



## **o júri**

presidente

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares  
Professor Catedrático, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

vogais

Prof<sup>a</sup>. Doutora Lúcia Maria das Candeias Guilhermino  
Professora Catedrática do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar,  
Universidade do Porto

Prof. Doutor Rui Afonso Bairrão da Rosa  
Investigador Principal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Prof. Doutor Sérgio Miguel Franco Martins Leandro  
Professor Adjunto, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto  
Politécnico de Leiria

Prof. Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado  
Investigador Principal, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro  
(orientador)





## **agradecimentos**

Este trabalho só foi possível graças as pessoas que de uma forma ou outra me ajudaram e estiveram envolvidas nesta etapa tão importante da minha vida.

Agradeço imensamente ao Doutor Ricardo Calado, pela orientação, atenção e demonstração de exemplo de competência e confiança durante essa caminhada.

À Doutora Liliam Hayd, minha co-orientadora no Brasil, que possibilitou minha vinda à Portugal. Muito obrigada pela confiança e dedicação ao longo de todos esses anos trabalhando juntas.

Agradeço também ao Doutor Fernando Ricardo, meu co-orientador em Portugal pela ajuda nos tão temidos ácidos gordos, mas principalmente pela paciência e tempo dedicados nesse trabalho.

Agradeço à todos os envolvidos no convênio de doutorado bipartido: FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) pelo auxílio a pesquisa, UEMS (Univesidade Estadual de Mato Grosso do Sul) pela bolsa concedida, estrutura e apoio na realização dos experimentos no Brasil, UA (Universidade de Aveiro) e ao DBIO (Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro), pela oportunidade em realizar o doutoramento em Portugal e também pela estrutura fornecida para realização dos experimentos.

Gostaria de agradecer também a toda equipe do departamento de Química da Univesidade de Aveiro, em especial à Professora Maria do Rosário Domingues, que possibilitou a realização das análises de ácidos graxos.

Agradeço também aos meus colegas: Ana, Luisa, Thiago, Maria, Marcela, Rita, Sara e Rui pela ajuda e companhia durante minha estadia em Aveiro. Ana Carolina, Violeta, Maíra, Moema, Eduardo, Bruna, Dona Milu e Seu Jorge serei eternamente grata por todos os momentos que estivemos juntos, vocês estarão para sempre em meu coração.

Quero agradecer também aos colegas que estiveram comigo no Brasil durante a realização dos meus experimentos: Eduardo, Thainara e Mayara. Tenho certeza que sem vocês as coletas nunca seriam tão proveitosas. Não posso deixar de agradecer à Miriam que muitas vezes me levou aos domingos à UEMS e a minha amiga Adriana que me acompanha desde sempre.

Finalmente deixo minha eterna gratidão à minha família especialmente aos meus pais e irmã pelo amor e apoio incondicional nesse momento. Esse sonho só foi possível graças a presença de vocês em minha vida.



**palavras-chave** Ácidos graxos, bioensaios, *Macrobrachium pantanalense*, organismos modelo, *Palaemon varians*

**resumo**

A aquicultura para fins não alimentares possui grande potencial comercial e social. Dentre as áreas que compreendem esta atividade, a utilização de organismos modelos em bioensaios tem tido grande destaque, uma vez que o emprego de espécies aquáticas em pesquisas depende de um fornecimento de organismos constante e confiável. Desta forma, tendo em vista a importância na manutenção destes organismos em laboratório, o presente trabalho teve como objeto de estudo os camarões Palaemonídeos *Macrobrachium pantanalense* e *Palaemon varians*. Estas espécies possuem interesse comercial e ecológico e, tendo em vista o seu potencial para utilização em bioensaios, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de protocolos de cultivo destes crustáceos decápodos *ex situ*.

O primeiro estudo deste trabalho consistiu na avaliação do perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas de *M. pantanalense*, de modo a auxiliar na seleção de reprodutores. Os resultados obtidos demonstraram que o investimento maternal em ácidos graxos para a prole é semelhante em fêmeas pequenas e grandes. Desta forma a seleção de reprodutores não pode ser baseada somente no tamanho das fêmeas ovígeras, uma vez que fêmeas de menores dimensões poderão produzir larvas com uma qualidade semelhante à produzida por fêmeas de maiores dimensões.

O segundo estudo realizado permitiu o desenvolvimento de um protocolo para larvicultura de *M. pantanalense*. Embora seja uma espécie dulcícola, *M. pantanalense* necessita de salinidade para completar o seu ciclo em condições laboratoriais. Os resultados obtidos demonstraram que a larvicultura a uma salinidade de 4 permitiu um melhor desenvolvimento larval, bem como a obtenção de decapoditos com maiores dimensões.

No terceiro estudo realizado, foi possível otimizar os protocolos de cultivo de *P. varians*, tendo os resultados obtidos demonstrado que a larvicultura realizada a salinidade 35 e com recurso ao início da alimentação exógena imediatamente após a eclosão permitiu realizar a metamorfose em menor tempo de cultivo larval. Adicionalmente, foi possível verificar que os decapoditos produzidos nestas condições apresentavam um maior tamanho e biomassa.

O quarto e último estudo realizado, abordou as respostas fenotípicas e fisiológicas de *P. varians* em diferentes cenários tróficos. Os resultados obtidos demonstraram que a escassez, ou a redução da qualidade nutricional, do alimento tem como consequência a mobilização de ácidos graxos para manutenção das funções vitais, resultando num pior desempenho dos organismos sujeitos a estes estressores. O presente trabalho permitiu evidenciar a existência de uma forte ligação entre as fases planctônica e bentônica dos crustáceos decápodes, bem como as consequências deletérias que o estresse nutricional pode ocasionar em diferentes fases do seu ciclo de vida.

Em conclusão, o presente trabalho avança o estado da arte referente ao cultivo de *M. pantanalense* e *P. varians* em condições *ex situ*, permitindo consolidar os conhecimentos iniciais necessários à utilização destes organismos como espécies modelo para a realização de bioensaios.



**keywords**

Bioassays, fatty acids, *Macrobrachium pantanalense*, model organisms, *Palaemon varians*.

**abstract**

Non-food aquaculture has great commercial and social potential. Among the areas that comprise this activity, the use of model organisms in bioassays has been highly emphasized, since the use of aquatic species in research depends on a constant and reliable supply of organisms. In this way, considering the importance in the maintenance of these organisms in the laboratory, the present work had as object of study the Palaemonidae shrimps *Macrobrachium pantanalense* and *Palaemon varians*. These species have high commercial and ecological interest and, in view of their potential for use in bioassays, this work aimed to improve the culture protocols of these decapod crustaceans *ex situ*.

The first study of this work consisted in the evaluation of the fatty acid profile of newly hatched larvae of *M. pantanalense*, in order to better select breeders. Results indicated that the maternal investment in fatty acids for the offspring is similar in small- and large-sized females. In this way, the selection of breeders can not be based solely on the size of ovigerous females, since smaller females can produce larvae of a quality similar to that produced by larger females.

The second study allowed the development of a protocol for *M. pantanalense* larviculture. Although this is freshwater species, *M. pantanalense* needs salinity to complete its cycle under laboratory conditions. Results showed that by using a salinity of 4 superiro larviculture results could be achieved in terms of survival at metamorphosis, as well as achieving larger decapodites.

In the third study, it was possible to optimize *P. varians* cultivation protocols. The results obtained showed that larviculture carried out at a salinity of 35, along with the beginning of exogenous feeding immediately after hatching, shortened larval duration to metamorphosis and produced larger and heavier decapodites.

The fourth and last study carried out, addressed the phenotypic and physiological responses of *P. varians* under different trophic scenarios. Results showed that the scarcity, or reduction of the nutritional quality, of food results in the mobilization of fatty acids to maintain vital functions, thus prompting a lower performance on the organisms exposed to these stressors. The present work also confirmed the existence of a strong connection between the planktonic and benthic phases of crustacean decapods, as well as the deleterious consequences that nutritional stress may cause in different phases of their life cycle.

In conclusion, the present work advances the state of the art of *M. pantanalense* and *P. varians* culture *ex situ*, thus allowing to consolidate the initial knowledge necessary to use these organisms as model species for bioassays.



## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Lista de figuras .....  | iv  |
| Lista de tabelas .....  | vii |
| Lista de abreviaturas .....   | ix  |
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....   | 1   |
| 1.1– Aquicultura: perspectivas globais .....  | 2   |
| 1.2 – Aquicultura de organismos não alimentares .....   | 6   |
| 1.2.1 – Utilização de organismos aquáticos como bioindicadores .....  | 7   |
| 1.2.2 – Espécies modelos para bioensaios .....  | 8   |
| 1.2.2.1 – <i>Macrobrachium pantanalense</i> , Dos Santos, Hayd & Anger, 2013 .....  | 9   |
| 1.2.2.2 – <i>Palemon varians</i> Leach, 1813 [in Leach, 1813-1814].....   | 15  |
| 1.3 – Aspectos nutricionais relevantes para a produção de organismos aquáticos .....  | 23  |
| 1.3.1 – Lipídeos e ácidos graxos.....   | 24  |
| 1.4 - Objetivos .....   | 28  |
| CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE REPRODUTORES E DESENVOLVIMENTO DE UM<br>PROTOCOLO DE CULTIVO DE <i>Macrobrachium pantanalense</i> EM LABORATÓRIO<br>..... | 29  |
| 2.1 – Efeito do tamanho maternal no perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas<br>de <i>Macrobrachium pantanalense</i> .....               | 30  |
| 2.1.1 – Introdução e objetivos.....   | 30  |
| 2.1.2 – Material e métodos .....  | 31  |
| 2.1.2.1 – Coleta e manutenção de reprodutores de <i>Macrobrachium pantanalense</i> .....  | 31  |
| 2.1.2.2. – Análise de ácidos graxos .....   | 33  |
| 2.1.2.3. – Análise de dados .....   | 34  |
| 2.1.3 – Resultados .....  | 34  |
| 2.1.4 – Discussão .....   | 36  |
| 2.2 – Larvicultura de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em diferentes salinidade.....   | 40  |
| 2.2.1 – Introdução e objetivos.....   | 40  |
| 2.2.2 - Material e métodos .....  | 41  |
| 2.2.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de <i>M. pantanalense</i> .....   | 41  |
| 2.2.2.2 - Cultivo larval.....   | 42  |
| 2.2.2.3 - Análise de ácidos graxos .....  | 43  |
| 2.2.2.4 - Análise de dados.....   | 43  |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.3 - Resultados .....  | 44 |
| 2.2.4 – Discussão .....   | 48 |
| CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CULTIVO DE <i>Palaemon varians</i> EM LABORATÓRIO .....  | 51 |
| 3.1 – Desenvolvimento larval de <i>Palaemon varians</i> exposto a diferentes salinidades e diferentes períodos de inanição após a eclosão ..... | 52 |
| 3.1.1 - Introdução e objetivos .....  | 52 |
| 3.1.2 - Material e métodos .....  | 53 |
| 3.1.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de <i>Palaemon varians</i> .....  | 53 |
| 3.2.2.2 - Cultivo larval .....  | 54 |
| 3.2.2.3 - Análise de ácidos graxos .....  | 56 |
| 3.2.2.4 - Análise de dados .....  | 57 |
| 3.1.3 – Resultados .....  | 58 |
| 3.1.4 – Discussão .....   | 65 |
| 3.2 – Desempenho de juvenis de <i>Palaemon varians</i> expostos a diferentes cenários tróficos pré - e pós-metamorfose .....                    | 68 |
| 3.2.1 – Introdução e objetivos .....  | 68 |
| 3.2.2 – Material e métodos .....  | 69 |
| 3.2.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de <i>Palaemon varians</i> .....  | 69 |
| 3.2.2.2 - Delineamento experimental e condições de cultivo .....  | 69 |
| 3.2.2.3 - Análise de ácidos graxos .....  | 72 |
| 3.2.2.4 - Análise de dados .....  | 72 |
| 3.2.3 - Resultados .....  | 73 |
| 3.2.4 – Discussão .....   | 78 |
| CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....  | 83 |
| 4.1 – Considerações finais .....  | 84 |
| 4.2 – Perspectivas futuras .....  | 85 |
| CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 87 |



## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Tendências da produção mundial da aquicultura: taxa média anual de crescimento percentual dos principais grupos de espécies para 1980 – 2015. ....  | 4  |
| Figura 2 - Tendências da produção mundial da aquicultura: taxa média anual de crescimento percentual dos principais grupos de espécies para 1980 – 2015. ....  | 4  |
| Figura 3 - Produção global aquícola em 2008. (a) Produção por quantidade. (b) produção por valor, excluindo plantas aquáticas .....  | 5  |
| Figura 4 - Exemplar de <i>Macrobrachium pantanalense</i> , oriundos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil .....  | 11 |
| Figura 5 - Fêmea ovígera (A) e macho (B) de <i>Macrobrachium pantanalese</i> , oriundos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. ....  | 11 |
| Figura 6 - Fêmeas ovígeras de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em início de desenvolvimento embrionário, oriundos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. ..   | 12 |
| Figura 7 - Desenvolvimento embrionário em <i>Macrobrachium pantanalense</i> . I: início de desenvolvimento e incubação dos embriões; II: desenvolvimento intermediário, olhos da larva pouco visíveis; III: período final do desenvolvimento e incubação dos embriões, olhos visíveis. ....  | 13 |
| Figura 8 - Reservas energéticas em zoea I de <i>Macrobrachium pantanalense</i> . ....  | 14 |
| Figura 9 - Análise FOFA (Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças) do cultivo de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em laboratório.....   | 15 |
| Figura 10 - Morfologia externa de <i>Palaemon varians</i> .....  | 16 |
| Figura 11 - Fêmea ovígera de <i>Palaemon varians</i> , embriões em final do período de incubação. ....   | 18 |
| Figura 12 - Desenvolvimento embrionário de <i>Palaemon varians</i> : (a) estágio I; (b) estágio II; (c) estágio III; (d) estágio IV; (e) estágio V; (f) larva recém eclodida. ....   | 19 |
| Figura 13 - Estruturas para identificação dos estágios de desenvolvimento larval de <i>Palaemon varians</i> : ZI – Decapodito. (a) olhos sesséis; (b) olhos pedunculados; (c) endopodito do urópode desenvolvido; (d) endopodito e exopodito do urópode desenvolvidos; (e) pleópodes desenvolvidos; (f) antena e pereiópodos desenvolvidos . | 20 |
| Figura 14 - Reservas energéticas em Zoea I de <i>Palaemon varians</i> . ....   | 21 |
| Figura 15 - Análise FOFA (Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças) do cultivo de <i>Palaemon varians</i> em laboratório.....  | 23 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 16 - Estrutura molecular dos ácidos graxos: a) ácidos graxos saturados (SFA), b) ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), c) ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) d), e) ácidos graxos altamente insaturados (HUFA). .....   | 26 |
| Figura 17 - Lagoa Baiazinha, localizada em Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil. Local de coleta de exemplares de <i>Macrobrachium pantanalense</i> . (a) Vista geral da lagoa. (b) Coleta de fêmeas ovígeras. ....  | 32 |
| Figura 18 - Sistema de maturação para crustáceos decápodes adaptado de Calado et al (2007c) – Laboratório de Carcinologia e Carcinicultura do Cerrado e Pantanal (CARCIPANTA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) em Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil: (a) visão geral do sistema de cultivo; (b) tanques de cultivo individual ..... | 33 |
| Figura 19 – Escalonamento multidimensional (MDS) do perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas de <i>Macrobrachium pantanalense</i> provenientes de fêmeas pequenas (FP) e fêmeas grandes (FG). ....   | 35 |
| Figura 20 - Regressão linear descrevendo a relação entre comprimento da carapaça (CC) e comprimento total (CT) em decapoditos de <i>Macrobrachium pantanalense</i> , oriundos do Pantanal de mato Grosso do Sul, Brasil.....  | 43 |
| Figura 21 - Larvicultura de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em salinidade 0. Sobrevivência/ estágio larval em dias de cultivo.....  | 44 |
| Figura 22 - Percentagem de decapoditos de <i>Macrobrachium pantanalense</i> obtidos ao final do cultivo em diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as salinidades de cultivo ( $p<0,05$ ). ....   | 45 |
| Figura 23 - Salina da Troncalhada, localizada em Aveiro, Portugal. Local de coleta de fêmeas ovígeras de <i>Palaemon varians</i> . ....   | 54 |
| Figura 24 - Sistema de maturação para crustáceos decápodes descrito por Calado et al (2007c): (a) visão geral do sistema de cultivo; (b) tanques de estabulação de reprodutores. ....   | 54 |
| Figura 25 - Cultivo individual de larvas de <i>Palaemon varians</i> em laboratório.....   | 55 |
| Figura 26 - Regressão linear descrevendo a relação entre comprimento da carapaça (CC) e comprimento total (CT) em decapoditos de <i>Palaemon varians</i> . ....   | 56 |
| Figura 27 - Sobrevivência larval de <i>Palaemon varians</i> submetido à inanição em salinidades de 25, 35 e 45. Sal. = salinidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0,05$ ). ....  | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 28 - Sobrevivência (%) de <i>Palaemon varians</i> de zoea I à decapoditos cultivados a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as salinidades ( $p<0,05$ ). .....   | 59 |
| Figura 29 - Desenvolvimento larval de <i>Palaemon varians</i> cultivados a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Sal. = salinidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de inanição dentro das salinidades ( $p<0,05$ ). .....  | 59 |
| Figura 30 - Sistema de recirculação para larvicultura de crustáceos decápodos descrito por Calado et al. (2008) .....  | 70 |
| Figura 31 - Cultivo individual de juvenis de <i>Palaemon varians</i> em laboratório.....   | 70 |
| Figura 32 - Cultivo (dias) de <i>Palaemon varians</i> em diferentes regimes tróficos. ME: metanáuplio de <i>Artemia</i> enriquecido; ME → Met: metanáuplio de <i>Artemia</i> enriquecido e metanáuplio de <i>Artemia</i> ; Met → ME: metanáuplio de <i>Artemia</i> e metanáuplio de <i>Artemia</i> enriquecido; Met: metanáuplio de <i>Artemia</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes níveis tróficos ( $p<0,05$ ). ..... | 75 |

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Produção mundial de pescado. Pesca extrativista, aquicultura e consumo de pescado (kg) entre os anos de 2013 e 2015. ....   | 3  |
| Tabela 2 - Produção aquícola mundial em toneladas entre os anos de 2000 e 2015. ....   | 5  |
| Tabela 3–Perfil de ácidos graxos (AG) de larvas recém eclodidas de <i>Macrobrachium pantanalense</i> provenientes de fêmeas pequenas (FP) e grandes (FG). Valores expressos em µg de ácido graxo/mg de peso seco. Média±desvio padrão. ....  | 36 |
| Tabela 4 - Larvicultura de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em diferentes salinidades: dias de cultivo, comprimento total e peso seco de decapoditos recém metamorfoseados. ....  | 46 |
| Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de <i>Macrobrachium pantanalense</i> cultivados em diferentes salinidades, valores expressos em µg AG/mg de peso seco. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ). ....   | 47 |
| Tabela 6 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças no perfil de ácidos graxos entre os decapoditos de <i>Macrobrachium pantanalense</i> provenientes de larvicultura realizada em diferentes salinidades. ....  | 47 |
| Tabela 7 - Comprimento total (CT) e peso seco (PS) de decapoditos recém metamorfoseados de <i>Palaemon varians</i> durante o cultivo a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de inanição dentro das salinidades ( $p<0,05$ ). ....                            | 60 |
| Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de <i>Palaemon varians</i> recém metamorfoseados cultivados em salinidade 25 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em µg AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p<0,05$ ). .... | 62 |
| Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de <i>Palaemon varians</i> recém metamorfoseados cultivados em salinidade 35 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em µg AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p<0,05$ ). .... | 63 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de <i>Palaemon varians</i> recém metamorfoseados cultivados em salinidade 45 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em µg AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p<0,05$ ). ..... | 64 |
| Tabela 11 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças significativas no perfil de ácidos graxos de decapoditos de <i>Palaemon varians</i> recém metamorfoseados expostos a diferentes salinidades durante a larvicultura. ....  | 65 |
| Tabela 12 - Desempenho de juvenis de <i>Palaemon varians</i> submetidos à diferentes regimes tróficos. ....  | 74 |
| Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos de decapoditos recém metamorfoseados de <i>Palaemon varians</i> obtidos em larvicultura com início da alimentação exógena em ZI ou ZII. Valores expressos em µg/mg de peso seco. ....  | 76 |
| Tabela 14 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças no perfil de ácidos graxos entre os decapoditos de <i>Palaemon varians</i> provenientes de larvicultura com início da alimentação exógena em ZI e ZII e juvenis obtidos ao final do cultivo em diferentes níveis tróficos. ....                     | 77 |
| Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos (AG) de juvenis de <i>Palaemon varians</i> , valores expressos em µg AG/mg de peso seco (média±desvio padrão). ....  | 78 |

## Lista de abreviaturas

|            |  |
|------------|--|
| AG         | Ácidos graxos  |
| ARA        | Ácido araquidônico   |
| CARCIPANTA | Laboratório de Carcinologia e Carcinicultura do Cerrado e Pantanal                             |
| CC         | Comprimento da carapaça  |
| Crontr.    | Contribuição da variável ácido graxo   |
| CT         | Comprimento total  |
| Cum.       | Contribuição cumulativa  |
| DBO        | Demanda Bioquímica de Oxigênio   |
| DC         | Dias de cultivo até decapodito   |
| DHA        | Ácido docosaexaenoico  |
| EPA        | Ácido eicosapentaenoico  |
| FAME       | <i>Fatty acids methyl esters</i> - Ésteres metilados de ácidos graxos                          |
| FG         | Fêmea grande   |
| FP         | Fêmea pequena  |
| GC         | <i>Gas chromatography</i> - Cromatografia gasosa   |
| GC-MS      | <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i> - Cromatografia gasosa em espectrômetro de massa |
| GP         | Ganho de peso  |
| HUFA       | <i>Highly unsaturated fatty acid</i> - Ácidos graxos altamente insaturados                     |
| MDS        | <i>Multidimensional scaling</i> - Escalonamento multidimensional                               |
| ME         | Metanáflio de <i>Artemia</i> enriquecido   |
| ME → Met   | Metanáflio de <i>Artemia</i> enriquecido e metanáflio de <i>Artemia</i>                        |
| Met        | Metanáflio de <i>Artemia</i>   |
| Met → ME   | Metanáflio de <i>Artemia</i> e metanáflio de <i>Artemia</i> enriquecido                        |
| MUFA       | <i>Monounsaturated fatty acid</i> - Ácidos graxos monoinsaturados                              |
| <i>p</i>   | Valor - <i>p</i>   |
| PB         | Proteína bruta   |
| PERMANOVA  | <i>Permutational analysis of variance</i> - Análise de variância permutativa                   |
| PS         | Peso seco  |
| PUFA       | <i>Polyunsaturated fatty acid</i> - Ácidos graxos poli-insaturados                             |
| Sal.       | Salinidade   |
| SFA        | <i>Saturated fatty acid</i> - Ácidos graxos saturados  |
| SIMPER     | <i>Similarity percentages routine</i> - Rotina de percentuais de similaridade                  |
| TCE        | Taxa de crescimento específico   |
| UEMS       | Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  |

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1– Aquicultura: perspectivas globais

O termo aquicultura pode ser definido como a produção de animais ou plantas que tenham habitat predominantemente aquático. Estes organismos são produzidos em uma grande variedade de sistemas aquáticos, nomeadamente águas doces, marinhas ou salobras (Asche, 2008; Lucas e Southgate, 2012; FAO, 2017). Na aquicultura, de um modo geral, o processo de produção pode ser determinado por fatores biológicos, tecnológicos e ambientais, sendo estes por vezes controlados pelo ser humano. Este controle possibilita a inovação, rápido desenvolvimento das espécies e redução de custos, garantindo assim, maior produção, competitividade e lucratividade (Anderson, 2002; Hannesson, 2003; Asche, 2008).

Embora a aquicultura seja uma tecnologia de produção de alimentos muito antiga, até a década de 70, não era considerada uma atividade importante em termos de quantidade de produção. Este fato é consequência das práticas intensivas na agricultura que possibilitam grandes produções com baixos custos (Asche, 2008). Entretanto, nas últimas décadas, a aquicultura foi um dos setores de produção de alimentos que mais cresceu no mundo devido ao aumento da tecnologia de cultivo, permitindo assim um maior controle da produção (FAO, 2017).

Apesar do crescimento da aquicultura, a captura de animais selvagens proveniente da pesca extrativista ainda é cerca de 60% maior que a produção aquícola. Todavia, o aumento da população mundial tem contribuído para o crescimento da atividade ano após ano. O consumo per capita de peixe aumentou de 19,7 kg para 20,3 kg nos anos de 2013 e 2015, respectivamente. Consequentemente houve um incremento de cerca de 6 milhões de toneladas na produção de animais aquáticos e também na contribuição da aquicultura na produção total de pescado (Tabela 1). Desta forma, é de salientar a importância da aquicultura como alternativa para o aumento de oferta de alimento nos próximos anos (FAO, 2014, 2017).

Quando comparada à outras atividades como a agricultura, por exemplo, a tecnologia de produção, pesquisa e o desenvolvimento da aquicultura ainda não é muito sofisticada. Além disso, o controle sobre o processo de produção ainda é limitado (Asche, 2008). Desta forma, há um grande potencial para inovações e crescimento, principalmente por ser uma atividade que pode ser realizada de maneira sustentável e reduzindo os impactos ambientais consequentes da sobrepesca, uma vez que os recursos aquáticos provenientes de águas marinhas, salobra e doce são finitos (Lucas e Southgate, 2012). A aquicultura possibilita deste



modo o aumento na produção de alimentos e possui um papel social relevante afetando direta e indiretamente os meios de subsistência das comunidades onde se insere.

Tabela 1 - Produção mundial de pescado. Pesca extrativista, aquicultura e consumo de pescado (kg) entre os anos de 2013 e 2015.

|                                      | 2013  | 2014  | 2015  |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Produção total de pescado (kg)       | 162,0 | 166,1 | 170,4 |
| Pesca extrativista (kg)              | 91,8  | 92,4  | 93,7  |
| Aquicultura (kg)                     | 70,2  | 73,7  | 76,6  |
| Contribuição da aquicultura (%)      | 43,4  | 44,4  | 45,0  |
| Consumo de peixe per capita (kg/ano) | 19,8  | 20,0  | 20,3  |

Nota: Produção de plantas não inclusa.

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

Como já conceituado, o cultivo de animais aquáticos depende da reprodução, manutenção e colheita de espécies em ambientes controlados e com intervenção humana. Nesse contexto, a aquicultura permite um grande número de possibilidades na atividade produtiva, sendo elas:

- Produção e cultivo de larvas, pós-larvas, alevinos e juvenis;
- Estocagem de juvenis capturados ou incubados em viveiros, tanques, tanque – rede até a fase de abate;
- Cultivo de animais adultos em lagoas privadas;
- Cultivo de espécies em sistema de policultivo ou consorcio com plantas;
- Cultivo de algas plantadas ou suspensas (FAO, 2017);

A aquicultura pode igualmente ser dividida em diferentes grupos relacionados às características da produção. Considerando o tipo de organismo produzido, a aquicultura é essencialmente dividida em quatro grandes áreas: produção de peixes, moluscos, crustáceos e algas (Lucas e Southgate, 2012). Neste cenário, a produção mundial de organismos aquáticos pode ser observada na Figura 1 e 2. A partir da década de 80 observa-se o crescimento da produção de organismos aquáticos ano a ano. A maior parte da produção é constituída por peixes de água doce, onde no ano de 2015 foram produzidos cerca de 44 milhões de toneladas de peixes, contribuindo com 57% da produção total, seguido da produção de moluscos com

16 milhões de toneladas produzidas e 21% de contribuição na produção total. Entretanto, apesar de possuírem alto valor econômico, os peixes marinhos e crustáceos contribuem apenas com 5% e 10% respectivamente da produção global.

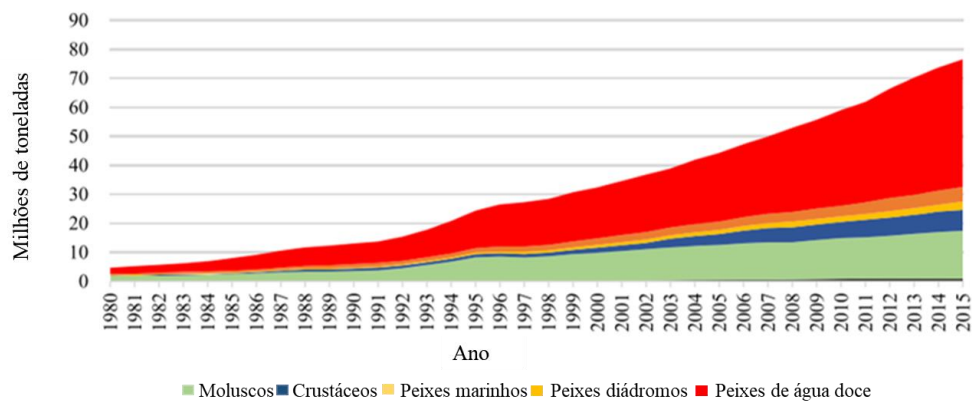


Figura 1 - Tendências da produção mundial da aquicultura: taxa média anual de crescimento percentual dos principais grupos de espécies para 1980 – 2015.

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

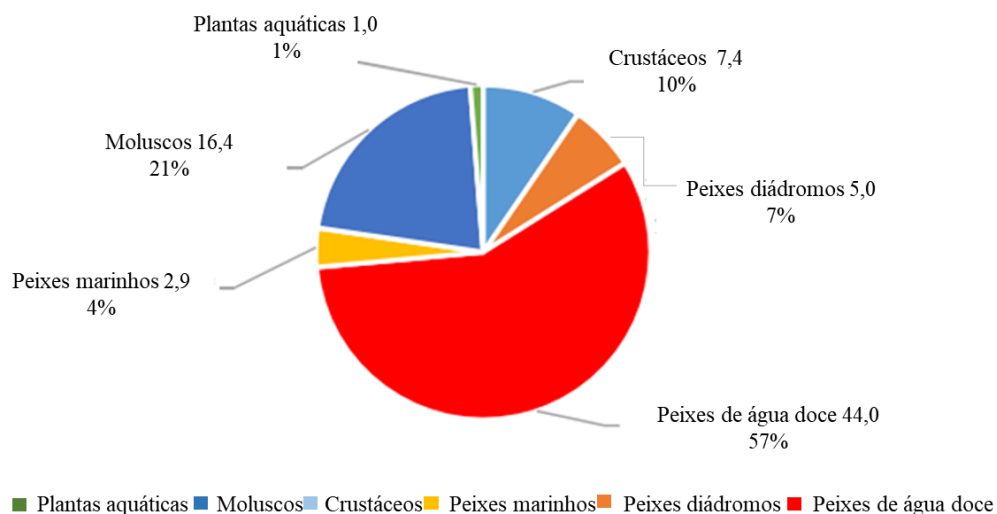


Figura 2 - Tendências da produção mundial da aquicultura: taxa média anual de crescimento percentual dos principais grupos de espécies para 1980 – 2015.

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

O continente asiático domina a produção de organismos aquáticos, representando 89% da produção mundial (Figura 3), sendo a China o maior produtor com cerca de 47 milhões de toneladas produzidas no ano de 2015 (Tabela 2). O continente Americano e Europeu detém a

segunda e terceira posição no ranking com representação de 4,6% e 4,4% respectivamente da produção mundial (Figura 3).

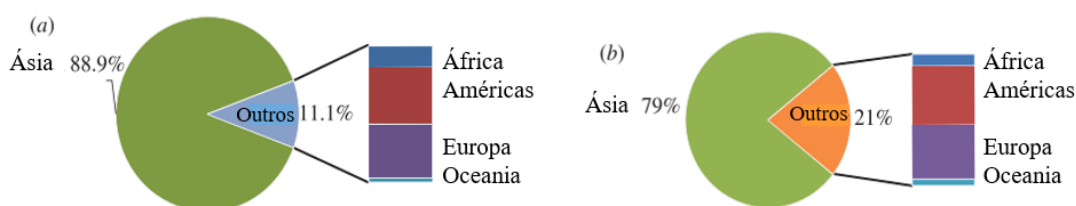


Figura 3 - Produção global aquícola em 2008. (a) Produção por quantidade. (b) produção por valor, excluindo plantas aquáticas.

Fonte: Adaptado de Bostock et al. (2010).

Tabela 2 - Produção aquícola mundial em toneladas entre os anos de 2000 e 2015.

| País       | Produção (mil toneladas) |        |        |
|------------|--------------------------|--------|--------|
|            | 2000                     | 2010   | 2015   |
| China      | 21,522                   | 36,737 | 47,612 |
| Índia      | 1,194                    | 3,786  | 5,235  |
| Indonésia  | 789                      | 2,363  | 4,380  |
| Vietnã     | 499                      | 2,683  | 3,438  |
| Bangladesh | 657                      | 1,309  | 2,060  |
| Noruega    | 491                      | 1,020  | 1,381  |
| Egito      | 340                      | 920    | 1,175  |
| Chile      | 392                      | 701    | 1,046  |
| Birmânia   | 99                       | 851    | 997    |
| Tailândia  | 738                      | 1,286  | 897    |
| Filipinas  | 394                      | 745    | 782    |
| Japão      | 763                      | 718    | 704    |
| Brasil     | 172                      | 411    | 575    |
| Coréia     | 293                      | 476    | 479    |
| Equador    | 61                       | 273    | 426    |

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

O desenvolvimento da indústria da aquicultura é favorecido por fatores geográficos e ambientais, além da proximidade de mercados viáveis. Assim, os países que possuem boas condições climáticas, bons subsídios e grande densidade populacional apresentam maior crescimento neste setor. Em termos gerais, a produção mundial aquícola tem se mantido estável. A tendência atual é que haja um grande aumento na produção nos países em desenvolvimento, onde os ambientes políticos e culturais são mais propícios a

empreendimentos novos. Além disso, espera-se que a aquicultura seja responsável por suprir a maior parte da demanda global de pescado nos próximos anos (Lucas e Southgate, 2012).

## 1.2 – Aquicultura de organismos não alimentares

A aquicultura possui um papel social relevante, envolvendo milhares de pessoas direta ou indiretamente, sendo fundamental nos meios de subsistência da população e da economia mundial (Ottinger et al., 2016; FAO, 2017; Grealis et al., 2017). No entanto, apesar de ser uma das indústrias com maior expansão no setor da produção alimentar, nem todos os organismos aquáticos são produzidos para o consumo humano. Uma fração destes produtos é aplicada em outros segmentos da indústria, tendo interesse para aplicações farmacêuticas, cosmecêuticas, nutracêuticas, bem como para a produção de biocombustíveis, espécies ornamentais, medidas de conservação e realização de bioensaios. A utilização destes organismos possibilita o avanço da biotecnologia, além de agregar valor a um grande número de espécies que não teriam qualquer interesse comercial e que deste modo contribuem para o desenvolvimento de novos mercados e da economia em geral (Davidson, 1995; Pomponi, 1999; Leal et al., 2016a).

Perante este enquadramento, o presente trabalho tem como foco a aquicultura de organismos não alimentares utilizados para fins acadêmicos, nomeadamente os crustáceos decápodes utilizados como bioindicadores em bioensaios laboratoriais. Os crustáceos decápodes têm tido grande destaque em pesquisas que avaliam os efeitos de agentes estressores em condições laboratoriais (Rainbow, 2002; Cottin et al., 2010, Chiarelli e Roccheri, 2014; Rodrigues e Pardal, 2014; Leal et al., 2016a Vitorino et al., 2017), nomeadamente em cenários de mudanças climáticas ocasionadas pela ação antrópica (Cottin et al., 2010; González-Ortegón et al., 2012; Raveux et al., 2012, Nieto et al., 2016).

As mudanças climáticas no meio ambiente podem alterar a distribuição, abundância, interações tróficas e a dinâmica populacional dos organismos nas comunidades, ocasionando impactos diretos ou indiretos nos ecossistemas (Thomas et al., 2004, Thornton et al., 2014, Beca-Carretero et al., 2017; Sorte et al., 2018). Tendo em vista a necessidade de conhecer as respostas dos organismos frente a diferentes estressores, a utilização de crustáceos decápodes em bioensaios tem possibilitado analisar e compreender os processos biológicos e fisiológicos destes organismos em cenários de alterações climáticas globais.

### 1.2.1 – Utilização de organismos aquáticos como bioindicadores

A ação antrópica teve como consequência a poluição dos ecossistemas aquáticos, por meio da industrialização e de efluentes domésticos, urbanos, e rurais ligados à agricultura (Prabhakaran et al., 2017). Os tóxicos são facilmente dispersos em ambientes aquáticos (Schöne e Krause, 2016), sendo que desta forma estão prontamente disponíveis para absorção e acumulação pelos organismos que os habitam. Deste modo, torna-se imperativo estudar os efeitos dos poluentes no ecossistema. Empregar métodos como o biomonitoramento é uma das formas de identificar, avaliar e gerenciar os riscos e consequências dos poluentes no meio ambiente, assim como sobre os recursos naturais (Cajaraville et al., 2000; Cervený et al., 2016). A avaliação de risco não pode ser baseada somente por meio de análises químicas de amostras ambientais, já que estas não fornecem indicações dos efeitos de contaminantes na biota (Gray, 1992). Deste modo, é assim necessário recorrer à utilização do biomonitoramento. Este procedimento pode ser conceituado como o uso sistemático das respostas de organismos vivos com o objetivo de avaliar as mudanças ocorridas no ambiente (Matthews et al., 1982).

Os bioindicadores são organismos utilizados para determinar o efeito biológico de alguma substância, fator ou condição, sendo fundamentais para o biomonitoramento (Knie e Lopes, 2004). A seleção destes organismos deve ser baseada na sensibilidade ou na tolerância que apresentam às condições a serem avaliadas (Washington, 1984), sendo a padronização dos organismos utilizados como bioindicadores fundamental para o sucesso de programas de biomonitoramento (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Um bioindicador ideal deve ser taxonomicamente bem definido e de fácil reconhecimento, até mesmo por não especialistas, apresentar distribuição geográfica ampla, ser abundante ou de fácil coleta/produção, ter baixa variabilidade genética e ecológica, baixa mobilidade, ciclo de vida longo e possibilidade de uso em laboratório (Rosenberg e Wiens, 1976; Johnson et al., 1993; Rainbow, 1995; Callisto e Gonçalves Jr, 2005; Newman e Clements, 2008; Zhou et al., 2008).

Nos últimos anos, vários organismos têm sido utilizados como bioindicadores para monitorar os impactos da ação antrópica nos ecossistemas aquáticos, onde estão incluídos plantas, peixes e invertebrados (Galloway et al., 2004; Zhou et al., 2008; Prabhakaran et al., 2017). Dentre estes, os invertebrados aquáticos são conhecidos por acumular altos níveis de metais em seus tecidos, possuírem alta tolerância a ambientes desfavoráveis e ter participação

ativa na ciclagem de nutrientes (Rainbow, 2002; Hamza-Chaffai, 2014; Sany et al., 2014). Além disso, os invertebrados aquáticos possuem uma posição chave como consumidores intermediários nas cadeias alimentares, sendo desta forma amplamente utilizados e reconhecidos como bons bioindicadores (Cesar et al., 2006; Malloy et al., 2007; Chiarelli e Roccheri, 2014).

### 1.2.2 – Espécies modelos para bioensaios

O termo organismos modelo refere-se a organismos que sejam utilizados para compreender princípios de fenômenos biológicos que não são unicamente específicos do objeto de estudo em si, mas que ocorrem também de uma maneira geral em outros organismos (Segner e Baumann, 2016). Assim, muitos bioindicadores são utilizados como organismos modelos em pesquisas para compreender as alterações que ocorrem no ecossistema. Essas espécies são utilizadas em ensaios laboratoriais para simular eventos no ecossistema e, desta forma, gerenciar as consequências bem como medidas paliativas. Para que sejam utilizados e mantidos em laboratórios, os organismos modelos devem atender a certos critérios técnicos, tais como a fácil manutenção *ex situ*, bem como o seu cultivo ser economicamente viável, apresentarem um ciclo de vida curto e potencial reprodutivo em cativeiro. Uma das principais vantagens de se utilizar organismos modelos produzidos em laboratório, e não recolhidos na natureza, é o controle total das condições de cultivo (p. e. temperatura e salinidade), das condições a que os organismos estiveram e estarão expostos (p. e. compostos químicos), de modo a permitir uma mais fácil correlação entre a resposta dos organismos e o agente estressor (Bonaventura et al., 2011).

Por serem utilizados em bioensaios, os organismos modelo devem obrigatoriamente ser padronizados, sendo crucial assegurar um fornecimento confiável e contínuo de biomassa (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). A utilização de organismos modelo em bioensaios, depende de uma infraestrutura em torno das espécies utilizadas (Ankeny e Leonelli, 2011; Leonelli e Ankeny, 2013; Leal et al., 2016a) que inclui invariavelmente sistemas de reprodução, cultivo e manutenção dos mesmos. Deste modo, muitos centros de pesquisas têm movimentado esforços para desenvolver e otimizar a aquicultura destes organismos em laboratório para suprir essa demanda (Leal et al., 2016a). Efetivamente, a aquicultura de invertebrados para fins de pesquisas tem se tornado um ramo da aquicultura com muito potencial. Esta atividade envolve trabalhos não somente com o organismos em si, mas

também na otimização da infraestrutura de cultivo (Ankeny e Leonelli, 2011; Leonelli e Ankeny, 2013; Ribas e Piferrer, 2014).

Nos últimos anos, várias espécies têm sido utilizadas em bioensaios, dentre os principais organismos estudados estão os macroinvertebrados aquáticos que representam os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (Magalhães e Ferrão Filho, 2008, Pavlaki et al., 2016). Dentre esses organismos, os crustáceos têm tido grande interesse nas pesquisas realizadas, principalmente por apresentarem respostas identificáveis à impactos múltiplos, específicos, difusos ou pontuais, podendo ser estabelecidas relações causa-efeito entre o estressor e o organismo (Chiarelli e Roccheri, 2014; Rodrigues e Pardal, 2014; Buss et al., 2016). A sensibilidade de um organismo frente à qualidade do seu ambiente pode ser a nível bioquímico, fisiológico ou comportamental. Essa sensibilidade depende não somente do fator a ser monitorado, mas também de fatores como a nutrição, a idade, o sexo e fase do seu ciclo de vida (Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Leonelli e Ankeny, 2013). Uma das características chave para a escolha de organismos modelo é o conhecimento de sua biologia em diferentes fases do seu ciclo de vida, da sua época de reprodução, do seu comportamento alimentar e da sua estrutura populacional (Rainbow, 1995).

Os crustáceos decápodes têm sido amplamente estudados em várias pesquisas sobre ecologia, impactos ambientais e efeito de alterações climáticas a escalas regionais e globais (Rainbow, 2002; Sany et al., 2014; Pavlaki et al., 2016). Nesse contexto, são apresentadas duas espécies de crustáceos decápodes, pertencentes à família Palaemonidae que, além do potencial para atividades aquícolas para consumo humano, fins ornamentais e insumo dentro da cadeia produtiva, são igualmente utilizadas como organismos modelo.

#### 1.2.2.1 – *Macrobrachium pantanalense*, Dos Santos, Hayd & Anger, 2013

Os camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 da família Palaemonidae são os mais explorados, tanto para cultivo comercial quanto para o cultivo experimental (Holthuis e Ng, 2010). Os camarões deste gênero possuem ampla distribuição geográfica e atualmente são conhecidas mundialmente 287 espécies (WoRMS, 2018a). Estudos recentes relacionados à estrutura populacional e à diversidade dos camarões de água doce na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul descrevem como mais abundantes as espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium* onde três dessas espécies são descritas para a região pantaneira:

*Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877), *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) e *Macrobrachium pantanalense* (Dos Santos et al., 2013; Hayd e Anger, 2013).

Os camarões provenientes do Pantanal Sul Matogrossense eram conhecidos como pertencente à população continental de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1262). Porém, diferenças observadas em relação à morfologia, bioquímica, fisiologia, taxonomia e genética entre os crustáceos encontrados em regiões costeiras (como o Pará) e a população interiorana (como o Pantanal) promoveram a realização de estudos que culminaram com a descrição de uma nova espécie, *M. pantanalense* (Anger et al., 2009; Anger e Hayd, 2009, 2010; Dos Santos et al., 2013; Hayd e Anger, 2013; Weiss et al., 2015).

*Macrobrachium pantanalense* apresenta rostro bem desenvolvido e dentado. Carapaça com espinhos antenais e sulco branquiespinhal presente. Os três últimos pares de pereiópodos possuem dactilus simples e telson com 2 pares de urópodos nadadeiras e dois pares de espinhas posteriores. De acordo com (WoRMS, 2018b) a sua descrição taxonômica é a seguinte:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Crustacea

Subclasse: Malacostraca

Superordem: Eucarida

Ordem: Decapoda (Latreille, 1802)

Subordem: Caridea (Dana, 1852)

Superfamília: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Família: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Gênero: *Macrobrachium* (Bate, 1868)

Espécie: *Macrobrachium pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013

*Macrobrachium pantanalense* (Figura 4) é uma espécie de coloração transparente com manchas castanhas presentes em todas as partes do corpo incluindo os apêndices. Apresenta pequeno porte, com o rostro bem desenvolvido, possui de nove a onze dentes na margem dorsal e de cinco a nove dentes na margem ventral. A carapaça possui espinhos antenais e hepáticos e um sulco branquiostegal. O abdômen é liso com seis segmentos. No telson, as margens laterais são retas e convergentes, terminando em um ponto mediano afiado, sua superfície dorsal possui dois pares de espinhos. Os juvenis são translúcidos e possuem o segundo par de pereiópodos finos, com um par de cerdas no telson. As descrições disponíveis



para os juvenis são inexistentes e dificultam a distinção de *M. pantanalense* de outras espécies do gênero *Macrobrachium* (Dos Santos et al., 2013).



Figura 4 - Exemplar de *Macrobrachium pantanalense*, oriundos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

*Macrobrachium pantanalense* é uma espécie gonocórica e assim, tal como outros crustáceos decápodes, a distinção entre os gêneros ocorre pela presença do apêndice masculino (Calado, 2008; Maciel e Valenti, 2009; Moraes-Valenti et al., 2010). Estudos realizados em diferentes locais do Pantanal Sul Matogrossense demonstraram que nesta espécie as fêmeas são maiores que os machos (Figura 5) (Hayd e Anger, 2013), diferindo assim do padrão de crescimento da maioria das espécies do gênero *Macrobrachium* onde geralmente as fêmeas são menores que os machos (Maciel e Valenti, 2009).

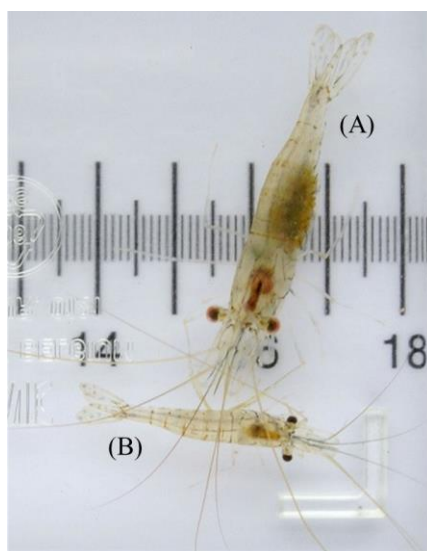


Figura 5 – Fêmea ovígera (A) e macho (B) de *Macrobrachium pantanalense*

Fonte: Hayd e Anger (2013).

A maturidade sexual ocorre quando os organismos atingem comprimento total de 19 mm e 20 mm em machos e fêmeas, respectivamente (Dos Santos et al., 2013; Hayd e Anger, 2013). Os machos não apresentam os morfotipos comuns noutras espécies do gênero, tais como *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) e *M. amazonicum* (Maciel e Valenti, 2009; Brown et al., 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010; Hayd e Anger, 2013; Pantaleão et al., 2014). A ausência de morfotipos nos camarões machos foi uma das diversas características morfológicas utilizadas para a diferenciação entre *M. amazonicum* e *M. pantanalense* e a posterior descrição da espécie.

O ciclo de vida de *M. pantanalense* é similar às outras espécies do gênero *Macrobrachium* (Hayd e Anger, 2013), sendo caracterizado por embrião, larva e adulto (Pinheiro e Hebling, 1998; Brown et al., 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010). As fêmeas de *M. pantanalense* apresentam cinco estágios de maturação, seguindo o mesmo padrão já descrito para o gênero *Macrobrachium*. No estágio I, o ovário é muito pequeno e transparente, no estágio II é esbranquiçado, no estágio III esverdeado e ocupa 1/3 do cefalotórax, no estágio IV é verde e ocupa 2/3 do cefalotórax e no estágio V a coloração verde ocupa toda a cavidade celômica do cefalotórax. Todos os oócitos produzidos em cada ciclo são liberados em uma única desova, e um novo ciclo pode ser iniciado logo após a desova, caso as condições ambientais sejam adequadas (Maciel e Valenti, 2009; Brown et al., 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Quando madura, a fêmea passa pela muda pré-nupcial e em seguida o macho deposita o espermatóforo em sua região abdominal. Cerca de 20 horas após a muda, a fêmea libera os oócitos que são fertilizados, sendo os ovos incubados na região abdominal (Figura 6) (Antheunisse e Van Den Hoven, 1968; Brown et al., 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010; Calado, 2017).



Figura 6 - Fêmeas ovígeras de *Macrobrachium pantanalense* em início de desenvolvimento embrionário, oriundos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

A fecundidade de *M. pantanalense* é considerada baixa quando comparada à exibida por *M. amazonicum*. Em populações estuarinas a fecundidade de *M. amazonicum* pode chegar até 6513 ovos e a 5706 ovos nas populações continentais. Entretanto, nas populações pantaneiras a fecundidade máxima encontrada foi de 676 ovos (Hayd e Anger, 2013; Vercesi e Hayd, 2015). Durante o período de incubação ocorre a mudança de coloração caracterizada pelo consumo de vitelo (Brown et al., 2010). Aquando do início da embriogênese, os embriões apresentam uma coloração verde escuro, passando posteriormente a verde claro até chegar à coloração transparente quando estes estão prestes a eclodir. O desenvolvimento embrionário dura cerca de 15 dias e é dividido em três estágios de desenvolvimento: (I) cerca de 100% do volume do ovo ocupado por vitelo e sem visibilidade dos olhos do embrião, (II) cerca de 50% do volume do ovo ocupado por vitelo, com formação visível dos olhos do embrião, (III) volume do ovo com pouca quantidade de vitelo e desenvolvimento completo dos olhos do embrião (Figura 12) (Hayd e Anger, 2013; Vercesi e Hayd, 2015). Durante o período de incubação, ocorre um aumento do volume dos embriões, tendo este fato como consequência a redução do espaço da câmara incubatória e perda de até 30% dos embriões em *M. pantanalense* (Vercesi e Hayd, 2015).



Figura 7 - Desenvolvimento embrionário em *Macrobrachium pantanalense*. I: início de desenvolvimento e incubação dos embriões; II: desenvolvimento intermediário, olhos da larva pouco visíveis; III: período final do desenvolvimento e incubação dos embriões, olhos visíveis.

As larvas de *M. pantanalense* eclodem como zoea (Anger, 2001) e apresentam lecitotrofia primária obrigatória em zoea I e facultativa em zoea II. Conseguindo sobreviver sem alimento por meio de suas reservas energéticas, localizadas na região dorsal do

cefalotórax (Figura 8). A quantidade de reservas energéticas presentes em zoea I *M. pantanalense* é menor que em zoea I de *M. amazonicum*. A partir de zoea III, as larvas tornam-se planctotróficas, sendo dependentes de alimentação exógena (Anger e Hayd, 2010).



Figura 8 - Reservas energéticas em zoea I de *Macrobrachium pantanalense*.

Fonte: Anger e Hayd (2010).

O desenvolvimento larval dura cerca de 30 dias, sendo dependente de salinidade para fechar seu ciclo em laboratório (Vercesi et al em preparação). Após a metamorfose os decapoditos (Anger, 2001) conseguem nadar livremente na coluna de água e em seguida assumem um estilo de vida bentônico. Quando adultos, atingem tamanho máximo de 58 mm e 65 mm em machos e fêmeas, respectivamente. Nesta fase do seu ciclo de vida são exclusivamente bentônicos e encontram-se associados à vegetação aquática (Hayd e Anger, 2013).

*Macrobrachium pantanalense* é uma espécie nativa do Pantanal Sul Matogrossense e possui grande potencial econômico. Esta espécie pode ser produzida em escalas comerciais para atender mercados como o de iscas vivas para pesca desportiva, presa viva ou congelada, de organismos ornamentais e também como organismo modelo (Valenti et al., 2011; Karim et al., 2015; Soares et al., 2017). O cultivo desta espécie em laboratório pode favorecer o comércio de iscas vivas, permitindo assim a promoção de um crescimento econômico e social do estado, uma vez que o Pantanal Sul Matogrossense possui grande potencial para prática da aquicultura, pois apresenta características físicas e climáticas favoráveis à atividade (Catella et al., 2008; Valenti et al., 2008, 2011). Além disso, o cultivo desta espécie pode ter um papel ecológico fundamental para a região por ser considerada uma espécie modelo para bioensaios (Soares et al., 2017).

A pecuária e a agricultura são as atividades econômicas mais desenvolvidas na região do Pantanal Sul Matogrossense, mas este tipo de atividades podem acarretar questões ecológicas importantes como o emprego de agrotóxicos e contaminação de corpos de água por meio da utilização dos mesmos. Desta forma, a utilização de *M. pantanalense* como organismo modelo pode auxiliar as pesquisas em relação à toxicidade e contaminação do ambiente (Soares et al., 2017).

As informações sobre *M. pantanalense* ainda são escassas devido a recém descrição da espécie. Assim, para que haja a produção deste crustáceo decápode em cativeiro ou laboratório ainda é necessário desenvolver e otimizar as tecnologias de cultivo para esta espécie (Figura 9). Além disso, existem muitas questões sobre a espécie a serem abordadas, principalmente em relação sua biologia e fisiologia. Nesse contexto, é possível observar um grande potencial aquícola para esta espécie (Figura 9). A concretização deste potencial torna necessário proceder ao investimento em trabalhos e pesquisas referentes aos principais gargalos para o desenvolvimento de técnicas de cultivo a uma escala comercial.

| Cultivo de <i>Macrobrachium pantanalense</i> em laboratório   |   |
|---|---|
| <p><b>F</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Espécie nativa do Pantanal Sul Matogrossense</li> <li>- Ciclo de vida longo: indicativo de respostas fisiológicas em várias fases do ciclo</li> <li>- Baixo custo de manutenção</li> <li>- Fácil manejo</li> </ul>   | <p><b>F</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Larvicultura extensa, com duração de até 30 dias</li> <li>- Literatura escassa</li> <li>- Carência de tecnologia para cultivo</li> </ul> |
| <p><b>O</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Redução da coleta de animais selvagens</li> <li>- Otimização dos recursos naturais</li> <li>- Cultivo em ambiente controlado</li> <li>- Produto com procedência conhecida</li> <li>- Produção constante de biomassa</li> <li>- Valorização de produto com interesse comercial</li> </ul> | <p><b>A</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Custo elevado com instalação de sistemas de suporte de vida</li> <li>- Utilização de outras espécies como organismos modelos</li> </ul>  |

Figura 9 - Análise FOFA (Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças) do cultivo de *Macrobrachium pantanalense* em laboratório.

#### 1.2.2.2 – *Palaemon varians* Leach, 1813 [in Leach, 1813-1814]

*Palaemon varians* é um crustáceo decápode, da Sub ordem Caridea, caracterizado pelo abdômen comprido e pela sobreposição do segundo segmento abdominal ao primeiro e terceiro. Pertence à família Palaemonidae e ao Gênero *Palaemon*, caracterizado pelo rostro bem desenvolvido e dentado, caparanga lisa com espinhos antenais e branquiostegal. Possui

telson com dois pares de urópodes e dois pares de espinhos posteriores. A margem posterior do telson é afunilada. O primeiro par de pereiópodo é delgado, possuindo dactilus simples (Figura 10) (Holthuis, 1952; González-Ortegón e Cuesta, 2006). De acordo com (WoRMS, 2018c) a sua descrição taxonômica é a seguinte:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Crustacea

Subclasse: Malacostraca

Superordem: Eucarida

Ordem: Decapoda (Latreille, 1802)

Subordem: Caridea (Dana, 1852)

Superfamília: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Família: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília: Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Gênero: *Palaemon* Weber, 1795

Espécie: *Palaemon varians* Leach, 1813 [in Leach, 1813-1814]

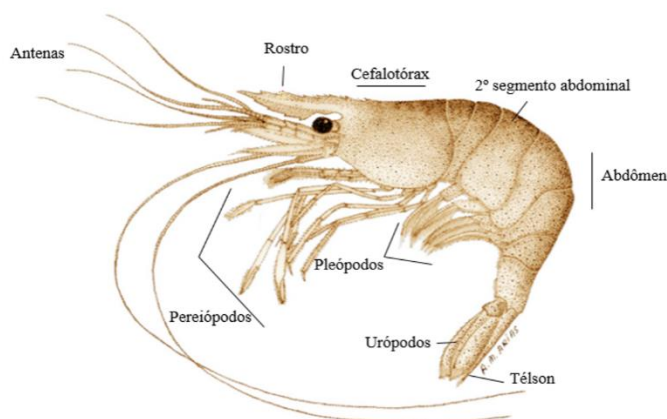


Figura 10 - Morfologia externa de *Palaemon varians*.

Fonte: Adaptado de Arias (2013).

*Palaemon varians* é uma espécie que apresenta características euritérmicas e euralinas, ou seja, possui grande capacidade de tolerar altas variações de temperatura e salinidade, respectivamente. Esta espécie pode ser encontrada em locais com temperatura e salinidade que variam de 0 à 33 °C e 0,9 – 45, respectivamente (Lofts, 1956; Dolmen et al., 2004; Palma et al., 2009; Cottin et al., 2010; González-Ortegón et al., 2013; New et al., 2014). Este camarão habita diversos corpos de água, sendo capaz de se desenvolver e reproduzir tanto em águas com baixíssima salinidade, como a salinidades superiores às da água do mar (35). No entanto, importa salientar que este organismo não é encontrado em ambiente dulcícola, sendo

então, considerada uma espécie intermediária entre os habitats marinho e de água doce (Dolmen, 1997; Falciai, 2001; Dolmen et al., 2004; González-Ortegón et al., 2006; Oliphant e Thatje, 2014a). Possui uma ampla distribuição geográfica, habitando estuários e lagunas costeiras em todo o noroeste da Europa, mediterrâneo ocidental e costa atlântica do Marrocos (Antheunisse et al., 1971; Holthuis, 1978; Yúfera e Rodríguez, 1985; Bouchon, 1991; Dolmen et al., 2004; Hampel et al., 2004; González-Ortegón e Cuesta, 2006).

Tal como outros crustáceos decápodes, *P. varians* tem hábitos alimentares onívoro-detritívoros, sendo consumidor primário e secundário na cadeia alimentar. Desta forma, possui papel fundamental na transferência de energia entre diferentes níveis tróficos (Escaravage e Castel, 1990). A predação é ativa e ocorre em toda a coluna de água por meio de ingestão da microfauna (Roberts, 1995), apresentando um pico de alimentação ao final do dia. Na primavera e no verão, épocas mais quentes e com maior luminosidade, ocorre um segundo pico de alimentação ao amanhecer. Este fato está associado à época reprodutiva destes organismos em que estes necessitam de maior quantidade de alimento para satisfazer as suas necessidades metabólicas (Aguzzi et al., 2005).

Este camarão possui pequeno porte, com o corpo quase incolor e translúcido, sendo possível em algumas fêmeas identificar pequenos cromatóforos esverdeados (González-Ortegón e Cuesta, 2006; Palma et al., 2008). Esta espécie é gonocórica (Calado, 2008) e assim, como na maioria dos crustáceos decápodes, *P. varians* apresenta dimorfismo sexual. A distinção entre os gêneros ocorre pela presença do apêndice masculino localizado no segundo par de pleópodes. Nesta espécie, as fêmeas são tendencialmente maiores do que os machos (Gurney, 1923; Rodríguez et al., 1993; Ruppert e Barnes, 1993), esta característica pode ser considerada vantajosa para a reprodução, uma vez que a fecundidade é correlacionada positivamente com o tamanho da fêmea (Bauer, 1991; Vercesi e Hayd, 2015).

O ciclo de vida de *P. varians* é curto (Palma et al., 2008), a maturação sexual ocorre quando atinge um comprimento total de 16 mm e 22 mm em machos e fêmeas, respectivamente (Antonopoulou e Emson, 1992; Gelin e Souty-Grosset, 2006). O aparelho sexual localizado no cefalotórax é composto por um par de gônadas. O aparelho reprodutor feminino é constituído por um ovário loboso e por dois oviductos que se abrem para o exterior pelos poros genitais situados na base do terceiro par de pereiópodes. Em *P. varians* o ovário é translúcido quando imaturo e conforme ocorre a maturação, este escurece tornando-se verde-escuro, cobrindo praticamente toda a porção dorsal do cefalotórax, indicando que a fêmea está fértil e apta para cópula. Já o aparelho sexual masculino é composto por um par de testículos de onde partem os canais deferentes que se abrem ao exterior por meio dos poros genitais



localizados no quinto par de pereiópodes (Antheunisse e Van Den Hoven, 1968; Calado, 2008; Brown et al., 2010; Calado, 2017).

A primeira muda pré-nupcial ocorre com a maturação sexual e tem como principal objetivo aumentar o espaço na câmara incubatória, local onde será depositada a massa de embriões durante a incubação. Neste tipo de muda ocorre o aparecimento de cromatóforos esverdeados que funcionam como camuflagem e de cerdas extras para facilitar o transporte dos embriões dos poros genitais para a câmara incubatória e prevenir a perda dos ovos (Gurney, 1923; Sollaud, 1923; Antheunisse e Van Den Hoven, 1968; Calado, 2008; Brown et al., 2010; Calado, 2017) característica em camarões carídeos (de um modo geral). Estas cerdas ocorrem somente durante a muda pré-nupcial, desaparecendo após a eclosão (Antheunisse e Van Den Hoven, 1968). O período reprodutivo ocorre em épocas onde há maior luminosidade (Bouchon, 1991), sendo iniciado pela muda pré-nupcial das fêmeas. A cópula ocorre após a muda, onde o macho deposita o espermatóforo junto ao terceiro par de pereiópodes. Em seguida, os oócitos são expelidos do oviducto e são fertilizados ao passarem pelo espermatóforo (Calado, 2008; Brown et al., 2010; Calado, 2017). Os embriões são incubados junto ao abdômen e protegidos pelos pleópodos (Figura 11), podendo a fecundidade variar entre 85 e 300 embriões por fêmea (Antonopoulou e Emson, 1992). O período de incubação dura cerca de 15 dias e é inversamente proporcional à temperatura do ambiente (Rodríguez et al., 1993). Durante o desenvolvimento embrionário a fêmea tem o hábito de agitar os pleópodos para oxigenar e remover partículas dos embriões (Ruppert e Barnes, 1993), aumentando deste modo a sobrevivência dos mesmos (Nazari et al., 2000).



Figura 11 - Fêmea ovígera de *Palaemon varians*, embriões em final do período de incubação.  
Fonte: Oliphant, 2013.



Ao longo da maturação ovariana, os oócitos iniciam um processo de síntese e acumulação de reservas denominada vitelogênese. O vitelo inclui uma grande variedade de elementos lipídicos e proteicos que serão consumidos pelo embrião durante o período de incubação. Em *P. varians* o desenvolvimento embrionário é caracterizado por cinco estágios diferentes, desde o momento da extrusão até à eclosão: Estágio I – oócito recém fertilizado, possuindo os embriões uma coloração verde escura e homogênea, conteúdo 100% de vitelo. Estágio II – o vitelo ocupa aproximadamente 75% do volume total do ovo. O embrião aparece como uma região transparente sem marcas aparentes, com colocação em tons amarelados. Estágio III – As manchas oculares começam a surgir. Neste estágio 50% do vitelo já foi consumido sendo possível notar a diferença entre a cor amarelada do vitelo e a coloração esbranquiçada do embrião; Estágio IV – Os pontos oculares apresentam forma oval definida. O vitelo ocupa 25% do ovo. Sua coloração é translúcida; Estágio V: Os olhos são visíveis e grandes. A região cefálica do embrião começa a ser definida. No momento antes da eclosão, o ovo é alongado e a região cefálica produz uma fissura na sua superfície para permitir à larva eclodir (Figura 12) (Rodríguez et al., 1993).

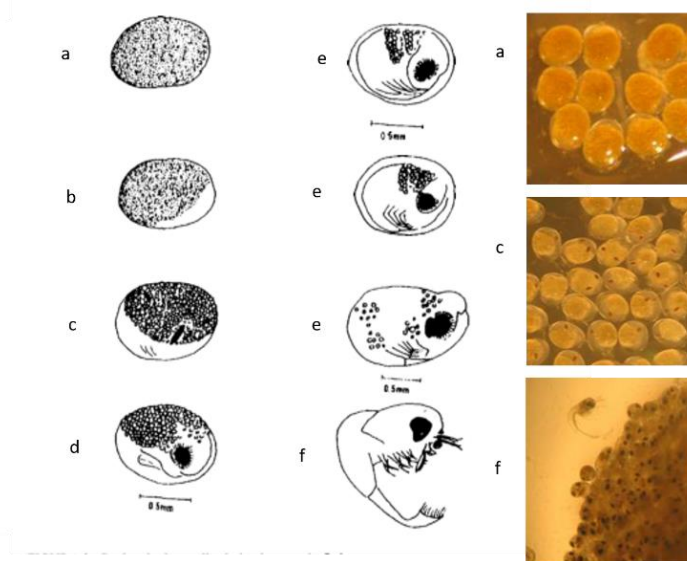


Figura 12 - Desenvolvimento embrionário de *Palaemon varians*: (a) estágio I; (b) estágio II; (c) estágio III; (d) estágio IV; (e) estágio V; (f) larva recém eclodida.

Fonte: Adaptado de Rodríguez et al., (1993) e Mendes (2008).

As larvas eclodem como zoea, apresentam fototaxia positiva e utilizam seus apêndices torácicos para natação, sendo esta realizada em toda a coluna de água de cabeça para baixo (Anger, 2001). Durante o seu desenvolvimento larval, *P. varians* apresenta cinco estágios de

zoea, sendo estes caracterizados pelo crescimento e desenvolvimento de pequenas formas morfológicas simples até à metamorfose em sua forma morfológica adulta onde a maioria das estruturas presentes é mais complexa (Fincham, 1979). Cada instar larval é caracterizado por mudanças específicas nas suas estruturas morfológicas. Nesse contexto, *P. varians* é considerado uma espécie de ciclo abreviado e de fácil identificação. As principais características para identificação de cada estágio larval estão apresentadas na Figura 13. A duração do ciclo larval é curto, durando cerca de 12 dias desde a eclosão até à metamorfose, dependendo esta duração das condições de cultivo (Yúfera e Rodríguez, 1985; Oliphant et al., 2013; Oliphant e Thatje, 2014a).

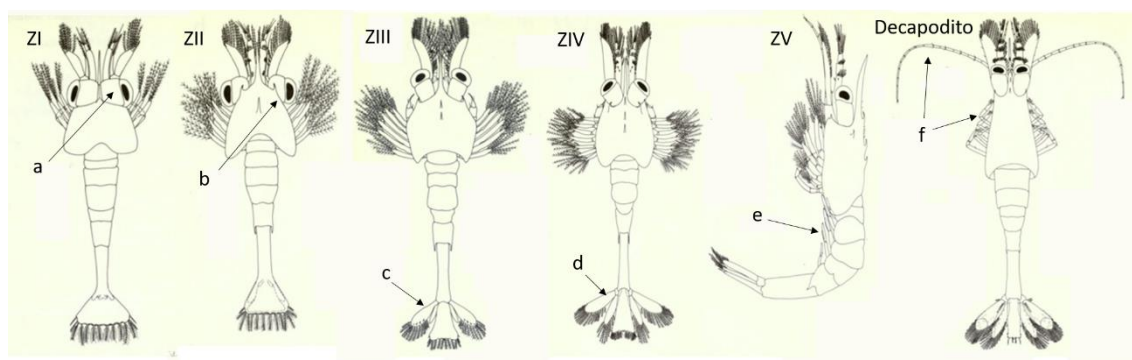


Figura 13 - Estruturas para identificação dos estágios de desenvolvimento larval de *Palaemon varians*: ZI – Decapodito. (a) olhos sesséis; (b) olhos pedunculados; (c) endopodito do urópode desenvolvido; (d) endopodito e exopodito do urópode desenvolvidos; (e) pleópodes desenvolvidos; (f) antena e pereiópodos desenvolvidos.

Fonte: Fincham (1979).

O desenvolvimento larval de *P. varians* ocorre em grande amplitude de salinidades, podendo variar entre 5 e 42 (Antonopoulou e Emson, 1988; Dolmen et al., 2004; Gelin e Souty-Grosset, 2006). Da mesma forma, o ciclo larval é bem sucessivo em grandes variações de temperaturas podendo ocorrer entre 10 e 30° C (Palma et al., 2009; Oliphant et al., 2013). A variação das condições ambientais retarda o crescimento e o desenvolvimento da larva prolongando o desenvolvimento larval. Consequentemente, este processo tende a resultar no aumento do número de instares larvais (Anger, 2001; Oliphant, 2013). Esta plasticidade no número de instares larvais pode ser considerada vantajosa, principalmente por permitir o desenvolvimento das larvas em condições sub-ótimas do ponto de vista ambiental e/ou trófico (Oliphant et al., 2013), explicando provavelmente assim o sucesso do desenvolvimento larval

de *P. varians* em diversas condições ambientais (Palma et al., 2009; Oliphant et al., 2013, 2014; Magozzi e Calosi, 2015).

As larvas de *P. varians* apresentam alta resistência à inanição, onde apesar da falta de alimento podem prosseguir até o terceiro estágio larval. Este fato está associado ao alto investimento maternal durante a embriogênese, onde parte da energia materna é utilizada como reserva tanto para o embrião quanto para a larva (Calado et al., 2010b; Oliphant et al., 2014; Oliphant e Thatje, 2014b). O investimento maternal em *P. varians* é considerado elevado e possibilita o desenvolvimento larval em períodos em que a alimentação exógena disponível seja escassa por meio do consumo das reservas lipídicas. As larvas de *P. varians* apresentam lecitotrofia primária facultativa de modo que nos dois primeiros estágios de desenvolvimento podem sobreviver somente por meio de suas reservas energéticas, localizadas na porção dorsal do cefalotórax se estiverem sujeitas a períodos de inanição ou de pouca abundância de alimento (Figura 14). A partir do terceiro estágio de zoea, as larvas são exclusivamente planctotróficas, estando assim dependentes da presença de alimento para se desenvolverem (Oliphant e Thatje, 2014b).

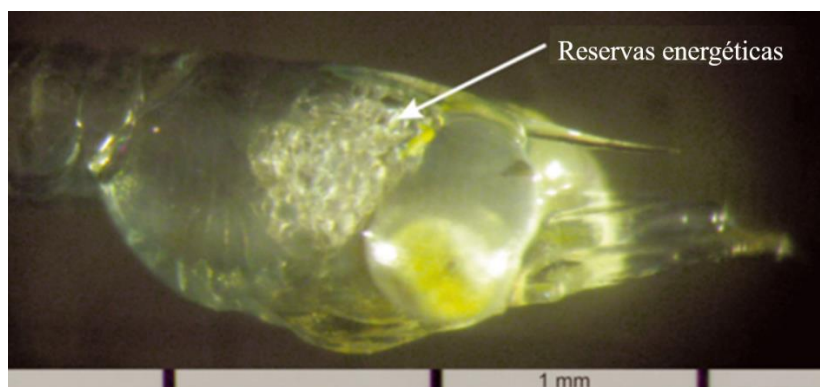


Figura 14 - Reservas energéticas em Zoea I de *Palaemon varians*.

Fonte: Adaptado de Oliphant e Thatje (2014b).

A ingestão é dependente do encontro com a presa sendo favorecida pela fototaxia positiva que tanto as larvas quanto as presas, que em sua maioria são espécies zooplactônicas, apresentam. As larvas de *P. varians* não apresentam um incremento gradual de ingestão no decorrer do desenvolvimento larval, como documentado na maioria das espécies de crustáceos Palaemonídeos (Barros e Valenti, 2003; Maciel et al., 2012; Coelho-Filho et al., 2018). Deste modo, há uma alta taxa de ingestão já em zoea I, que aumenta ligeiramente em zoea II e se mantém constante até o fim do desenvolvimento larval. Este fato pode ser

associado à estabilização dos requisitos nutricionais, ou ainda a uma perda da eficiência na captura de presas de menores dimensões e/ou uma necessidade de presas maiores (Yúfera e Rodríguez, 1985).

Após o desenvolvimento larval, os decapoditos nadam livremente na coluna de água e em seguida assumem hábitos bentônicos. Quando chegam à fase adulta estes camarões podem atingir um comprimento total de até 39,6 mm e 46,5 mm, para machos e fêmeas, respectivamente (Antonopoulou e Emson, 1992; Falciai, 2001; Gelin e Souty-Grosset, 2006). Nesta fase do seu ciclo de vida, estes camarões são inteiramente bentônicos, raramente nadam na coluna de água, estando por vezes associado a algas e outra vegetação aquática (Hindley, 2011).

*Palaemon. varians* é uma espécie com grande interesse econômico e biológico. Apesar do seu pequeno porte, é uma espécie que geralmente é capturada para consumo humano, sendo transacionada sob o nome comum de camarinha e atingindo preços de mercado semelhantes aos de algumas espécies de peneídeos (vulgo gambas) (Palma et al., 2008; Palma et al., 2015). Além disso, a utilização de *P. varians*, tanto na fase larval quanto na adulta, como presa viva ou congelada melhora as taxas de crescimento de organismos aquáticos mais exigentes como por exemplo o cavalo marinho *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829), o peixe pipa *Syngnathus typhle* (Linnaeus, 1758) e o choco *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). Deste modo, esta espécie pode ser uma fonte de alimento alternativa à utilização de rações comerciais, de náuplios de *Artemia* e misidáceos (Sykes et al., 2006; Correia et al., 2008, 2016; Palma et al., 2008; Palma et al., 2012). Além de ser um alimento de boa qualidade nutricional, a sua utilização tende a facilitar o manejo alimentar bem como a reduzir os custos na produção, uma vez que poderá representar uma redução noutras fontes alimentares, tais como *Artemia*.

Por apresentar um ciclo de vida curto, e ser de fácil manutenção em cativeiro, esta espécie de camarão tem sido amplamente utilizado como espécie modelo em ensaios laboratoriais, nomeadamente em ecotoxicologia e no estudo de alterações climáticas globais (Jorge Palma et al., 2008; Cottin et al., 2012; Rainbow e Smith, 2013; New et al., 2014; Correia et al., 2016; Pavlaki et al., 2016).

A versatilidade e o potencial desta espécie na aquicultura de organismos não alimentares é notória (Figura 15). A utilização destes organismos, seja como espécie forrageira ou espécie modelo, depende da qualidade e da procedência do mesmo, de modo a assegurar um fornecimento ininterrupto de biomassa. O cultivo de *P. varians* pode assim permitir a produção destes organismos em escala comercial de modo a suprir a demanda.

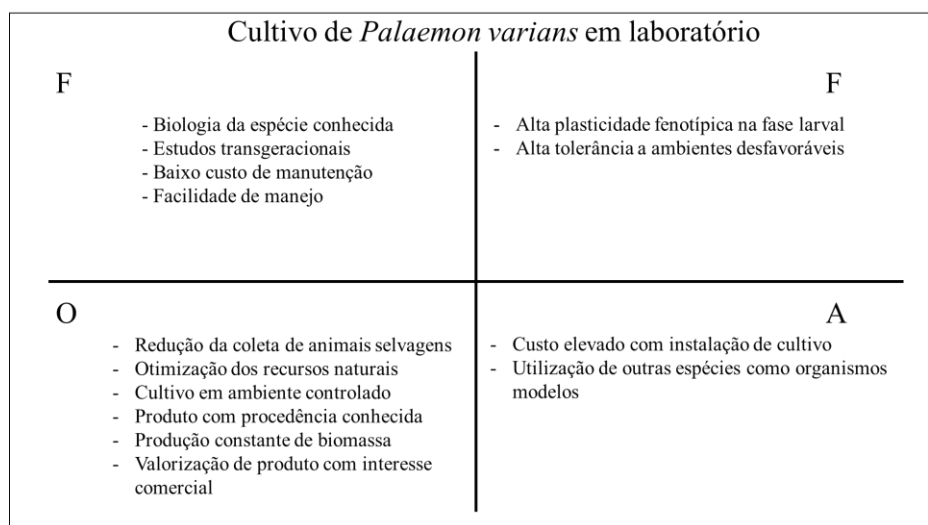


Figura 15 - Análise FOFA (Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças) do cultivo de *Palaemon varians* em laboratório.

### 1.3 – Aspectos nutricionais relevantes para a produção de organismos aquáticos

As informações sobre os aspectos da nutrição básica para organismos aquáticos que não se destinem à alimentação humana são ainda escassas devido à concentração dos esforços de pesquisa nas espécies de interesse alimentar. Nesse contexto, há um nível desproporcional das pesquisas quando se compara esses dois ramos da aquicultura (para consumo humano vs. outras aplicações não alimentares) (Craig et al., 2017). A nutrição destas espécies deve ser explorada em todos seus aspectos, sobretudo pelo valor comercial que alguns organismos podem apresentar (Leal et al., 2016a, b).

Embora tenham havido muitos avanços na nutrição de organismos aquáticos, existem grandes diferenças entre a nutrição de espécies alimentares e não alimentares (Sicuro, 2017). A nutrição de organismos destinados à alimentação humana é baseada no custo de produção e na capacidade dos organismos ganharem peso. Contudo, na nutrição de espécies não alimentares não há a necessidade imperativa em otimizar crescimento, neste caso a nutrição dos organismos é muito mais importante para atender os requerimentos nutricionais das espécies, com foco principalmente na sua saúde, reprodução e sobrevivência da prole (Craig et al., 2017).

A aquicultura depende da capacidade em maximizar a eficiência da produção. Desta forma, existe um grande interesse em otimizar a produção de ovos, larvas, juvenis e adultos, garantindo que estes tenham boa qualidade e elevadas taxas de sobrevivência (Craig et al.,

2017). Os embriões dos crustáceos decápodes são dependentes dos nutrientes do vitelo para sua sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, as larvas em seus primeiros estágios apresentam lecitotrofia primária obrigatória ou facultativa, sendo que a sua sobrevivência depende das reservas energéticas provenientes do investimento maternal durante a embriogênese (Rodríguez et al., 1993; Anger e Hayd, 2010; Calado et al., 2010b; Oliphant et al., 2014; Oliphant e Thatje, 2014a). Dietas nutricionalmente ineficientes podem afetar a fecundidade e a fertilidade das fêmeas por meio da má formação de embriões ou da baixa sobrevivência da prole (Izquierdo et al., 2001; Mossolin e Bueno, 2002; Müller et al., 2004). A fonte inicial de todo processo, desde a eclosão até a metamorfose é condicionado pela alimentação e condição nutricional dos reprodutores. As dietas parentais são assim consideradas cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência dos embriões e larvas, tendo um papel determinante no ciclo de vida dos crustáceos decápodes (Wouters et al., 2001; Watanabe e Vassallo-Agius, 2003; D'Abramo e New, 2010; Olivotto et al., 2011; Craig et al., 2017).

Após a fase lecitotrófica, as larvas tornam-se dependentes de alimento exógeno, sendo este limitante, quantitativa e qualitativamente, ao seu desenvolvimento e sobrevivência. Na vida selvagem, as larvas encontram alta disponibilidade de zooplâncton o qual, em conjunto com outros organismos não zooplânctônicos, é utilizado como fonte de alimento (Olivotto et al., 2011). No entanto, quando mantidas em cativeiro, as larvas são dependentes da oferta de alimento por parte do produtor. A alimentação das larvas deve garantir assim quantidade e qualidade suficiente para que os organismos em cultivo completem esta fase determinante do seu ciclo de vida e realizem com sucesso a metamorfose (Olivotto et al., 2017).

O conhecimento dos requisitos nutricionais e fisiológicos dos crustáceos decápodes ainda é bastante limitado, principalmente em relação às espécies utilizadas em ensaios laboratoriais (Calado et al., 2010a). Entender os aspectos relacionados às exigências nutricionais das espécies, bem como as respostas dos organismos frente a cenários adversos como a escassez de alimento, por exemplo, é fundamental para estabelecer protocolos de cultivo laboratorial.

#### 1.3.1 – Lipídeos e ácidos graxos

Os lipídeos desempenham um papel importante no desenvolvimento dos organismos aquáticos, estando envolvidos em várias funções biológicas nomeadamente armazenamento e

transporte de energia, formação das membranas celulares e síntese de hormônios lipossolúveis (Cho et al., 1986; Nelson e Cox, 2014). As funções dos lipídeos são tão diversas quanto a sua composição química. Os lipídeos podem ser divididos em polares e não polares (Dowhan et al., 2008; Corsino, 2009). Os lipídeos polares são compostos pelos glicolipídeos e os fosfolipídeos, componentes estruturais importantes das membranas celulares. Os glicolipídeos e os fosfolipídeos atuam como barreira permeável seletiva nas células e organelas. Os lipídeos não polares são compostos esteróis, ceras e ácidos graxos livres, podendo ser catabolizados de maneira a fornecer energia metabólica quando necessário (Cho et al., 1986; Corsino, 2009; Dowhan et al., 2008; Nelson e Cox, 2014).

Os lipídeos são provavelmente uma das biomoléculas mais estudadas durante todas as fases de desenvolvimento dos crustáceos (Cavalli et al., 1999; Chim et al., 2001; Tropea et al., 2015; Zupo et al., 2015), desempenhando funções fisiológicas importantes no seu ciclo de vida. Nos crustáceos decápodes, os lipídeos são fundamentais no processo de ecdise e de reprodução, estando relacionados à maturação gonadal e desempenho reprodutivo como fecundidade e fertilidade (Harrison, 1990; Calado et al., 2009; Cavalli et al., 2000; Wouters et al., 2001; Gastelú et al., 2011; Ribeiro et al., 2012; Zupo et al., 2015). Tal como a maioria dos invertebrados, os crustáceos são, de um modo geral, incapazes de sintetizar *de novo* colesterol, fosfolipídios e ácidos graxos essenciais de modo a suprir as suas necessidades nutricionais. Dessa forma, estes nutrientes precisam estar disponíveis para os organismos através da sua dieta alimentar (Tacon, 1987; Muriana et al., 1993; Ruppert e Barnes, 1993; Pontes e Andreatta, 2003).

Os ácidos graxos (AG) são os principais constituintes dos lipídeos e a sua composição determina as propriedades físico-químicas e o valor nutricional da fração lipídica dos alimentos (Webster e Lin, 2002; Nelson e Cox, 2014). Os AG são ácidos carboxílicos, formado por cadeias de átomos de carbono que se ligam a átomos de hidrogênio com um radical carboxílico em sua extremidade (Cho et al., 1986; Corsino, 2009). O comprimento da cadeia varia de acordo com a quantidade de carbono presente em sua estrutura, contendo de 4 a 36 carbonos. Os AG são geralmente classificados de acordo com o grau de insaturação que apresentam ao longo da sua cadeia hidrocarbonada. Resumidamente, podemos definir os AG saturados (SFA) como aqueles que não apresentam insaturações, os AG monoinsaturados (MUFA) como os que apresentam uma dupla ligação ao longo da cadeia e os AG poli-insaturados (PUFA) como os que apresentam mais de duas duplas ligações na cadeia de carbono. Além disso, considerando as suas peculiaridades biológicas, outras subclasses têm sido cada vez mais usadas na classificação de AG, como por exemplo os ácidos graxos

altamente insaturados (HUFA) que incluem os ácidos graxos poli-insaturados com quatro ou mais ligações duplas (Figura 16) (Brett e Muller-Navarra, 1997; Silva et al., 2002; Das, 2006; Macedo et al., 2012; Nelson e Cox, 2014).

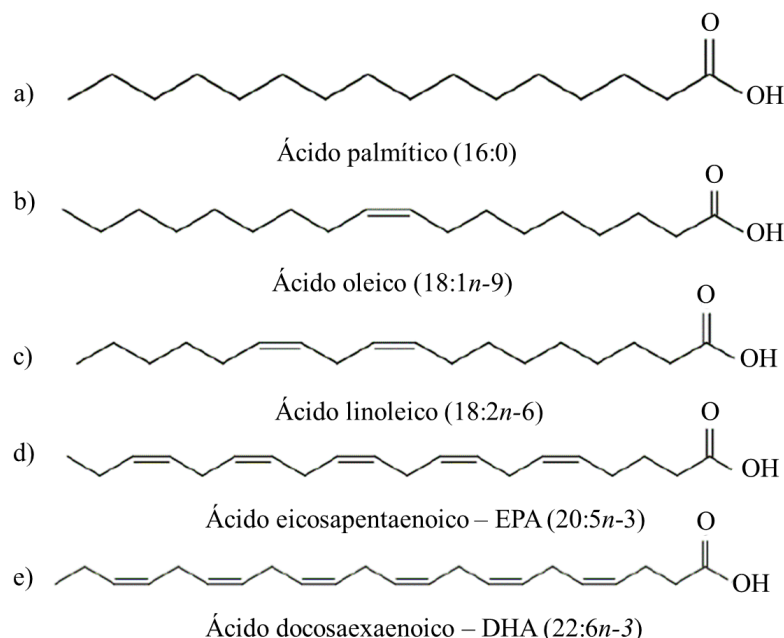


Figura 16 - Estrutura molecular dos ácidos graxos: a) ácidos graxos saturados (SFA), b) ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), c) ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) d), e) ácidos graxos altamente insaturados (HUFA).

Fonte: Adaptado de Ricardo (2017).

Os AG também podem ser classificados em não essenciais quando o organismo consegue sintetizar o AG ou em essenciais, quando não são sintetizados *de novo* pelo organismo em quantidades suficientes para a manutenção dos seus processos fisiológicos, sendo assim adquiridos exógenamente através da alimentação (Rainuzzo et al., 1995; González-Félix et al., 2002; Nelson e Cox, 2014). Em crustáceos decápodes, os PUFA são exemplos de AG essenciais, uma vez que esses organismos tem capacidade limitada em sintetizar *de novo* os AG linoleico (18:2 $n$ -6) e linolênico (18:3 $n$ -3). Da mesma forma, os HUFA também são essenciais aos crustáceos devido a sua capacidade limitada (ou inexistente) de converter PUFA em AG de cadeias maiores e mais insaturadas, tais como os AG araquidônico (20:4 $n$ -6; ARA), eicosapentaenóico (20: 5 $n$ -3; EPA) e docosahexaenóico (22:6- $n$ 3 DHA) (Kanazawa et al., 1979; Tacon, 1987; Rainuzzo et al., 1995; Cook e



McMaster, 2002). Estes AG são componentes das membranas celulares, sendo importante em vários processos fisiológicos, tais como a osmorregulação, ativação do sistema imunológico e o crescimento. Além disso, atuam diretamente na síntese de hormônios (Cho et al., 1986). Desta forma, as dietas devem garantir o fornecimento destes AG, uma vez que estão diretamente ligados à manutenção das funções vitais dos organismos (Sorgeloos e Léger, 1992; Bell e Sargent, 2003; Das et al., 2007; Glencross, 2009; D'Abramo e New, 2010; Olivotto et al., 2017).

As práticas de aquicultura para bioensaios requerem a manutenção adequada dos organismos utilizados (Zupo et al., 2015; Leal et al., 2016a). Desta forma, a alimentação destes organismos deve ser equilibrada de modo a atender suas necessidades nutricionais. A qualidade da alimentação é fundamental para que se tenha indivíduos saudáveis. Os AG de uma maneira geral estão entre os nutrientes mais relevantes nos embriões dos crustáceos, desempenhando um papel fundamental da estrutura da membrana celular e também como forma de reserva energética (Arts et al., 2009). A dieta parental é crucial ao desenvolvimento dos embriões e eclosão das larvas (Tlustý et al., 2005; Calado et al., 2009; Leal et al., 2012a; Zupo et al., 2015). A variabilidade de AG em relação à sua composição e abundância pode ser atribuída à fatores biológicos ligados às características de cada espécie como a fase de desenvolvimento do organismo e/ou a fatores ambientais e/ou sazonais (Bottino et al., 1980; Glencross, 2009; Guary et al., 1975; 1976, Ricardo et al., 2015, 2017; Rey et al., 2017). Nesse contexto, o conhecimento do perfil de AG de uma determinada espécie pode fornecer informações sobre a sua ecologia básica caracterizando assim as interações tróficas que ocorrem durante seu ciclo de vida.

Nos ambientes aquáticos a principal fonte de AG essenciais são os produtores primários, sendo estes compostos retidos seletivamente e transferidos consecutivamente ao longo da cadeia alimentar. Perante os atuais cenários inerentes às mudanças climáticas é expectável que estas possam promover impactos dramáticos nas interações tróficas no meio aquático (Bulletin et al., 2017; Wang et al., 2017). Desta forma conhecer o perfil de AG pode ajudar a entender melhor os processos fisiológicos que ocorrem em determinadas condições que podem ser simuladas em laboratório. O perfil de ácidos graxos das espécies além de permitir o conhecimento dos requerimentos nutricionais da mesma, possibilita igualmente prever as consequências de mudanças bióticas e abióticas ocorridas em seu habitat no desempenho e sobrevivência de indivíduos, populações e até mesmo da própria espécie a nível local, regional e global.

#### 1.4 - Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral desenvolver e otimizar protocolos e técnicas de cultivo *ex situ* de crustáceos decápodes utilizados em bioensaios. Para este propósito foram definidas quatro hipóteses nulas a testar no presente estudo:

I – O investimento maternal de fêmeas selvagens de *Macrobrachium pantanalense* de diferentes classes de tamanho não promove a existência de variações significativas no perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas.

II – O desenvolvimento larval e o perfil de ácidos graxos de larvas de *Macrobrachium pantanalense* não variam com a salinidade.

III – A salinidade e o número de horas de inanição após a eclosão larval não afetam o desenvolvimento e o perfil de ácidos graxos de larvas de *Palaemon varians*.

IV – O fornecimento de alimentação exógena imediatamente após a eclosão ou apenas no estágio larval de zoea II, assim como a utilização de uma presa viva (metanáuplios de *Artemia*) com um perfil enriquecido em ácidos graxos não afetam o desempenho larval nem o perfil de ácidos graxos de juvenis de *Palaemon varians*.

## CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE REPRODUTORES E DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CULTIVO DE *Macrobrachium pantanalense* EM LABORATÓRIO

## 2.1 – Efeito do tamanho maternal no perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense*

### 2.1.1 – Introdução e objetivos

A aquicultura é um dos setores da indústria alimentícia com maior expansão nos últimos anos, sendo fundamental para a subsistência da população e economia mundial (FAO, 2017). No entanto, nem todos os organismos aquáticos são destinados à alimentação humana, uma vez que uma grande fração destes organismos tem sido utilizados em outros segmentos industriais agregando valor a espécies com pouco interesse comercial. Dentro do conceito de aquicultura não alimentar, estão os organismos modelo utilizados em bioensaios (Pomponi, 1999; Leal et al., 2016a).

A utilização de organismos modelo tem sido cada vez mais aplicada nomeadamente, em pesquisas relacionadas aos impactos ambientais ocasionadas pelas mudanças climáticas (Bouquet et al., 2009; Bonaventura et al., 2011). Nos últimos anos, várias espécies de macroinvertebrados aquáticos (p.e. crustáceos) têm sido empregadas neste tipo de pesquisa (Magalhães e Ferrão Filho, 2008, Pavlaki, 2016). Os crustáceos têm tido grande interesse nas pesquisas, permitindo assim estabelecer as relações causa – efeito entre os estressores ambientais e o organismos (Chiarelli e Roccheri, 2014; Rodrigues e Pardal, 2014; Buss et al., 2016).

*Macrobrachium pantanalense* é um crustáceo decápode com potencial para utilização como espécie modelo para bioensaios (Soares et al., 2017). Esta espécie é endêmica do Pantanal Sul Matogrossense (Hayd e Anger, 2013), local conhecido pela grande diversidade e abundância de vida selvagem. Contudo, o Pantanal é um bioma frágil e bastante vulnerável às mudanças climáticas ocasionadas pelas alterações globais (Junk et al., 2014; 2006). Deste modo, a utilização de espécies nativas em bioensaios torna-se crucial para avaliações de risco de forma confiável nesta região geográfica, uma vez que espécies modelo generalizadas podem subestimar o risco ambiental (Zagatto e Bertoletti, 2014). No entanto, este camarão carideo é uma espécie descrita recentemente (Dos Santos et al., 2013), o que torna imprescindível o desenvolvimento de uma tecnologia adequada para o seu cultivo e manutenção em laboratório, bem como a realização de mais estudos referentes aos seus

aspectos biológicos e bioquímicos, essenciais para o estabelecimento de metodologias de cultivo.

O perfil de ácidos graxos (AG) de larvas recém eclodidas provenientes de fêmeas selvagens pode fornecer informações sobre a ecologia da espécie, além de permitir a seleção de reprodutores para formação de plantel. As reservas nutricionais utilizadas pelo embrião e larva são oriundas do investimento maternal durante a embriogênese (Calado et al., 2010b; Oliphant et al., 2014; Oliphant e Thatje, 2014b). Deste modo, a seguinte hipótese nula foi testada: o investimento maternal de fêmeas selvagens de *M. pantanalense* de diferentes classes de tamanho não promove a existência de variações significativas no perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas

#### 2.1.2 – Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carcinologia e Carcinicultura do Cerrado e Pantanal (CARCIPANTA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) em Aquidauana, Brasil e seguiu as etapas descritas abaixo.

##### 2.1.2.1 – Coleta e manutenção de reprodutores de *Macrobrachium pantanalense*

As fêmeas ovígeras utilizadas neste trabalho foram obtidas na Lagoa Baiazinha no Pantanal de Miranda, Miranda-MS (20°15.795'W e 20°15.795'S) em Setembro de 2016 (Figura 17). A coleta foi realizada no período matutino, com auxílio de uma peneira retangular de 1,20 x 0,70 m (malha de 1 mm) passada cuidadosamente no fundo da lagoa, embaixo dos camalotes de aguapé (*Eichhornia azurea*) e depois retirada da água em áreas próximas às margens. Dentre os animais retidos na peneira foram selecionadas somente fêmeas ovígeras em estágio de desenvolvimento embrionário III. Este estágio é caracterizado pela coloração translúcida dos ovos devido a pouca quantidade de vitelo e pela alta visibilidade dos olhos dos embriões (Hayd e Anger, 2013; Vercesi e Hayd, 2015). O transporte ao laboratório foi realizado em recipientes de polietileno (20 L) contendo abrigos individuais e aeração.



Figura 17 - Lagoa Baiazinha, localizada em Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil. Local de coleta de exemplares de *Macrobrachium pantanalense*. (a) Vista geral da lagoa. (b) Coleta de fêmeas ovígeras.

Após a coleta e aclimação, 10 fêmeas ovígeras foram classificadas em pequenas e grandes de acordo com o comprimento da carapaça (CC: comprimento da margem pós-orbital à margem médio-posterior dorsal do cefalotórax). A biometria foi realizada por meio de um paquímetro digital com precisão 0,01 mm (Digimess) e as classes de tamanho: pequena (FP) e grande (FG), foram determinadas com base nos dados apresentados por Hayd e Anger (2013). Foram selecionadas 5 fêmeas ovígeras pequenas (CC 5–9 mm) e 5 fêmeas ovígeras grandes (CC 10–13 mm).

As fêmeas ovígeras selecionadas foram cultivadas individualmente em aquários de 25 L no sistema de maturação com recirculação de água do laboratório (adaptado de Calado et al., 2007) (Figura 18). Durante o período de cultivo os crustáceos foram mantidos em temperatura 28 °C, fotoperíodo 12:12 (claro: escuro) alimentados 4 vezes ao dia com filé de peixe ( ) e ração comercial com 32% PB (Goldfish Colours Bits–Alcon®) de modo *ad libitum*. Após a eclosão, as larvas foram sifonadas e pesadas (balança analítica com precisão 0,0001 g Dhaus). Posteriormente, as larvas foram liofilizadas (Enterprise I, Terroni) para análise do perfil de ácidos graxos (AG).



Figura 18 - Sistema de maturação para crustáceos decápodes adaptado de Calado et al (2007c) – Laboratório de Carcinologia e Carcinicultura do Cerrado e Pantanal (CARCIPANTA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) em Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil: (a) visão geral do sistema de cultivo; (b) tanques de cultivo individual.

#### 2.1.2.2. – Análise de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos (AG) das larvas recém eclodias foi obtida por meio de uma amostra composta de larvas liofilizadas de cada fêmea, totalizando assim, 5 réplicas para cada classe de tamanho. Os ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) foram obtidos por meio de metilação ácida (Adaptado de Christie, 1989). Foram usados 0,5 mg do total da massa de zoea I obtidas de cada fêmea das duas classes de tamanho: FP (fêmeas pequenas) e FG (fêmeas grandes) e posteriormente adicionado 1 mL de ácido sulfúrico (2,5%) em metanol. Após incubação a 80 °C, foi adicionado 1 mL de padrão interno (19:0) e 1,5 mL de cloreto de sódio (0,9 %), tendo esta mistura sido agitada no vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. No final foram obtidas duas fases, sendo a fase orgânica (superior) transferida para vials e seca em corrente de nitrogênio. Por fim, as amostras foram re-suspendidas em 700 µL de hexano e 2 µL desta mistura foram injetadas.

Os FAME (Fatty acids methyl esters - Ésteres metilados de ácidos graxos) extraídos das amostras, foram determinados e quantificados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, GC-MS (Shimadzu QP2010 Ultra) equipado com uma coluna (DB-FFAP) de 30 m

de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,32 µm de espessura de filme (J&Wscientific). O equipamento GC foi conectado ao detector seletivo de massa (Agilent 5973), operando em modo de impacto de elétrons a 70 eV, digitalizando a faixa m/z 50 – 550 em um ciclo de 1 segundo em modo de varredura. A temperatura do equipamento foi programada a partir de uma temperatura inicial de 80 °C com aumento linear de 25 °C por minuto até 160 °C, 2 °C até 210 °C e 30 °C até 250 °C. A temperatura do injetor e do detector foram de 220 e 230 °C respectivamente. Foi utilizado gás hélio como transportador em fluxo de 0,5 mL por minuto.

Os picos de AG foram integrados individualmente no software do equipamento e identificados considerando o tempo de retenção e o espectro de massa de cada ácido graxo em relação a uma mistura de padrões injetada anteriormente (C6-C24, Supelco 37 Component Fame Mix). O conteúdo de AG nas amostras analisadas foi calculado considerando a relação entre a massa, a área do AG integrado e o padrão interno (19:0). Os SFA foram definidos pela ausência de insaturação, os MUFA como todos os AG com 1 insaturação e no presente estudo os AG com  $\geq 2$  dupla ligação foram considerados como PUFA.

#### 2.1.2.3. – Análise de dados

A matriz de similaridade dos dados foi obtida por meio do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, seguindo a transformação de  $\log x+1$ . As diferenças multivariadas dos dados amostrais foram analisados usando escalonamento multidimensional (MDS). O perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas de FP e FG foram comparados por meio de uma PERMANOVA (análise multivariada permutativa de variância) de uma via. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando uma significância de  $p<0,05$ . A análise de dados foi realizada com o software Primer 6 com o complemento PERMANOVA (Primer – E Ltd., Plymouth, Reino Unido).

#### 2.1.3 – Resultados

O resultado da análise MDS baseado no perfil de ácidos graxos (AG) está representado na Figura 19 e demonstra a similaridade do perfil de AG de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense* provenientes de FP e FG.



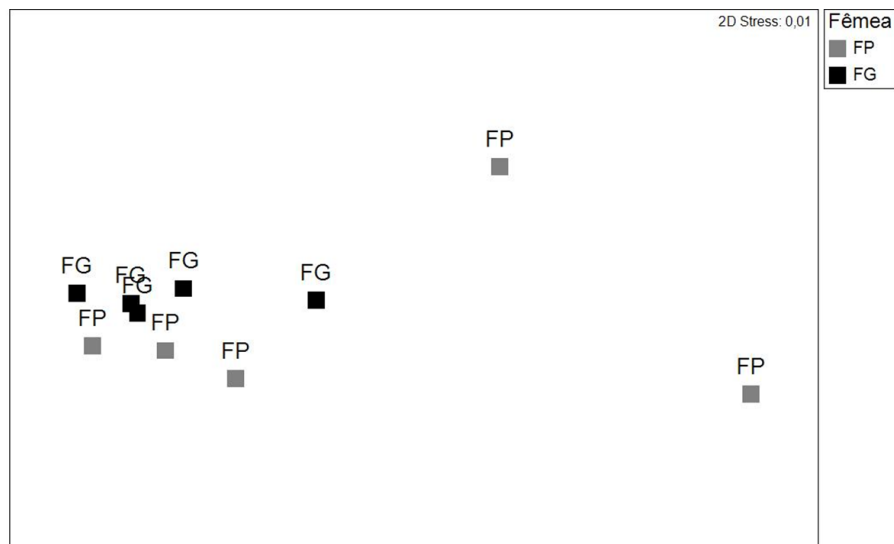


Figura 19 – Escalonamento multidimensional (MDS) do perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense* provenientes de fêmeas pequenas (FP) e fêmeas grandes (FG).

A PERMANOVA de uma via realizada demonstrou que o perfil de AG de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense* provenientes de FP e FG não diferiu estatisticamente ( $p>0,05$ ). A Tabela 3 resume o perfil de AG de larvas recém eclodias provenientes de FP e FG.

Embora não apresentem diferenças significativas, as larvas provenientes de FG possuem uma maior quantidade AG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) PS do que as larvas provenientes de FP. Os AG com maior representatividade foram os seguintes: 16:0 e 18:0, 18:1 $n$ -9 e 22:2 $n$ -6 e 22:6 $n$ -3. Quando considerados agrupados em classes, os SFA apresentam uma maior abundância, representando 59% e 61% do total de AG de larvas provenientes de FP e FG, respectivamente. Por outro lado, os MUFA representam 27% e 22% e os PUFA 10% e 14% do total de AG de larvas provenientes de FP e FG, respectivamente.

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos (AG) de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense* provenientes de fêmeas pequenas (FP) e grandes (FG). Valores expressos em µg de ácido graxo/mg de peso seco. Média±desvio padrão.

| AG      | Classes de tamanho |             |
|---------|--------------------|-------------|
|         | FP                 | FG          |
| 14:0    | 2,14±1,21          | 3,32±1,22   |
| 15:0    | 0,94±0,56          | 1,45±0,53   |
| 16:0    | 24,44±15,84        | 35,11±15,35 |
| 17:0    | 1,86±1,08          | 3,31±1,40   |
| 18:0    | 9,13±6,03          | 12,82±4,94  |
| 20:0    | 1,00±0,64          | 1,56±0,26   |
| 22:0    | 0,97±0,62          | 2,24±1,26   |
| Σ SFA   | 40,50±25,68        | 59,83±23,71 |
| 16:1n-9 | 2,75±2,24          | 4,09±1,66   |
| 16:1n-7 | 0,79±0,59          | 0,74±0,10   |
| 17:1n-9 | 0,70±0,47          | 1,01±0,24   |
| 18:1n-9 | 10,12±8,74         | 10,05±3,51  |
| 18:1n-7 | 3,28±2,19          | 3,34±1,56   |
| 20:1n-9 | 0,87±0,63          | 1,11±0,17   |
| Σ MUFA  | 18,54±13,83        | 21,36±7,05  |
| 20:2n-6 | 0,43±0,24          | 0,89±0,03   |
| 20:4n-6 | 0,79±0,46          | 1,30±0,56   |
| 20:5n-3 | 0,67±0,36          | 1,05±0,28   |
| 22:2n-6 | 2,09±0,13          | 4,13±0,11   |
| 22:6n-3 | 3,36±2,36          | 6,17±0,94   |
| Σ PUFA  | 7,36±4,68          | 13,57±1,82  |
| Total   | 68,56±45,72        | 97,00±32,89 |

SFA= ácidos graxos saturados; MUFA = ácidos graxos monoinsaturados; PUFA = ácidos graxos poli-insaturados.

#### 2.1.4 – Discussão

Na maioria dos invertebrados aquáticos, os traços da história de vida larval, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência, estão ligados aos nutrientes proveniente do investimento maternal durante a embriogênese (Giménez, 2006). Assim, o investimento maternal mobilizado para a próxima geração pode ser avaliado por meio da determinação do perfil bioquímico de embriões e larvas (Rey e Calado, 2016). Este trabalho concentra-se no

perfil de ácidos graxos (AG) de larvas recém eclodidas de *Macrobrachium pantanalense* possibilitando a seleção de reprodutores por meio do investimento maternal.

O metabolismo dos lipídios desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de crustáceos, uma vez que representam a fonte mais importante de energia no desenvolvimento dos mesmos (Yao et al., 2006). Nos crustáceos decápodes, cerca de 60% do conteúdo lipídico pode ser transferido aos oócitos durante a maturação ovariana (Graeve e Wehrtmann, 2003; Kattner et al., 2003) e transferidos às larvas com capacidades lecitotróficas (Anger, 2001). A fonte de lipídeos mobilizados neste processo pode ser proveniente de reservas no hepatopâncreas (Anger, 2001) ou derivado diretamente da ingestão de alimento (Harrison, 1990). Desta forma a história de vida maternal pode ter influência na composição lipídica da prole (Anger, 2001). Nesse contexto, a variabilidade intraespecífica observada neste trabalho (Figura 19) pode ter sido ocasionada pela condição nutricional e fatores ambientais a que estiveram expostas as fêmeas ovígeras, tal como referido previamente por outros autores (Anger, 2001; Rey et al., 2017), uma vez que as larvas analisadas no presente estudo são provenientes de fêmeas selvagens coletadas já ovígeras no seu habitat natural.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o investimento maternal em AG é semelhante tanto em FP quanto em FG de *M. pantanalense*. Deste modo, a seleção de reprodutores não necessita ser baseada exclusivamente no tamanho apresentado pelos organismos. As altas concentrações de SFA (Tabela 3) observadas, principalmente dos AG 16:0 e 18:0 (Tabela 3), podem ser consideradas como o principal manancial de energia metabólica disponível para as larvas catabolizarem, uma vez que oxidação destes AG favorece a obtenção de energia (Turner et al., 2003). As larvas de *M. pantanalense* apresentam lecitotrofia primária facultativa, sendo estas capazes de sobreviver somente por meio das reservas energéticas por até uma semana após a eclosão (Anger e Hayd, 2010). As altas concentrações de SFA em larvas recém eclodidas de *M. pantanalense* foram já relatadas por Urzúa e Anger (2011), tendo sido igualmente assinaladas em larvas de outros crustáceos decápodes com capacidades lecitotróficas (Nates e McKenney, 2000; Moraes et al., 2002; Kattner et al., 2003; Calado et al., 2007a; Urzúa e Anger, 2011). Tendo em consideração o período das secas que ocorrem no Pantanal Sul Matogrossense e, consequentemente, a baixa disponibilidade de alimento que ocorre nesta época (Cardoso et al., 2012), os altos índices de SFA apresentados pelas larvas recém-eclodidas podem favorecer a sobrevivência destas em períodos onde haja escassez de recursos alimentares. Este cenário de limitação trófica, quer do ponto de vista quantitativo e/ou qualitativo, é particularmente relevante perante as presentes

alterações climáticas, como aquelas que já tem ocorrido na região ocupada por *M. pantanalense* (Silio-Calzada et al., 2017).

Os crustáceos decápodes tem uma capacidade limitada em sintetizar *de novo* alguns AG das famílias *n*-6 e *n*-3. (Sánchez-Paz et al., 2006; D'Abramo e New, 2010). A capacidade de alongar e dessaturar estes AG em HUFA (ácidos graxos altamente insaturados) tais como o 20:4 *n*-6 (ARA), 20:5 *n*-3 (EPA) e 22:6 *n*-3 (DHA), é limitada, principalmente em camarões de água doce, sendo estes AG considerados como essenciais e procedentes da alimentação (D'Abramo e New, 2010). Neste trabalho foram observadas pequenas concentrações de PUFA (Tabela 3) diferentemente das concentrações observadas por (Urzúa e Anger, 2011) em larvas recém eclodidas de *M. pantanalense*. Este fato estará seguramente associado à alimentação dos reprodutores, uma vez que no trabalho referido os crustáceos mantidos em laboratório foram alimentados com isópodes marinhos, sendo estes a possível fonte de PUFA observada nas larvas obtidas. Efetivamente, os PUFA de cadeia longa *n*-3 são maioritariamente originários do fitoplâncton, sendo posteriormente acumulados por animais marinhos ao longo das interações tróficas que ocorrem na cadeia alimentar (Neves et al., 2015). Todavia, no presente trabalho, os crustáceos analisados foram obtidos em ambientes totalmente dulcícolas, sendo previsível que apenas pequenas concentrações de PUFA fossem observadas. Neste contexto é notória a importância da manutenção dos organismos em laboratório, uma vez que o alimento fornecido aos reprodutores condiciona de forma direta e determinante a composição bioquímica das larvas.

As fêmeas ovígeras coletadas para o presente trabalho foram obtidas em setembro de 2016, período caracterizado pela estação seca no Pantanal que ocorre entre os meses de maio à novembro (Alho, 2008; Cardoso et al., 2012). Os AG mobilizados durante a embriogênese foram provavelmente metabolizados pelas fêmeas na estação das águas (cheia), período onde há uma maior disponibilidade de recursos alimentares (Gomes e Agostinho, 1997; Lourival et al., 2000; Agostinho et al., 2004; Alho, 2008). Desta forma, a composição de AG de larvas recém-eclodidas poderá permitir avaliar eventuais interferências e/ou mudanças que possam ter ocorrido na dieta das populações destes camarões. Este aspecto é particularmente relevante na região pantaneira onde o fluxo de nutrientes disponível é alterado pelos período de seca/cheia que ocorrem na região (Cardoso et al., 2012; Silio-Calzada et al., 2017).

*Macrobrachium pantanalense* é um camarão carídeo dulcícola endêmico do Pantanal Sul Matogrossense apenas descrito recentemente (Dos Santos et al., 2013). Deste modo, as informações referentes à sua dinâmica reprodutiva e composição bioquímica são ainda escassas, embora seja reconhecida como uma espécie com grande importância ecológica e

econômica para a região (Valenti et al., 2011; Karim et al., 2015; Vercesi e Hayd, 2015; Soares et al., 2017). Os resultados obtidos neste trabalho não permitem rejeitar a hipótese nula proposta. Desta forma, o investimento maternal de fêmeas selvagens de *Macrobrachium pantanalense* de diferentes classes de tamanho não promove a existência de variações significativas no perfil de ácidos graxos de larvas recém eclodidas. Face à importância da espécie e o seu elevado potencial para utilização em bioensaios, é importante clarificar que a seleção de reprodutores não deve ser baseada somente no tamanho dos reprodutores, pois o perfil bioquímico em ácidos graxos de larvas recém eclodidas não é condicionado de forma significativa pelo investimento maternal realizado por fêmeas de diferentes tamanhos. A seleção de reprodutores de maiores dimensões pode sim ser favorecida pelo fato destes apresentarem uma maior taxa de fertilidade, pois fêmeas de maiores dimensões dão origem a descendências maiores (maior número de larvas) (Vercesi e Hayd, 2015).

## 2.2 – Larvicultura de *Macrobrachium pantanalense* em diferentes salinidade

### 2.2.1 – Introdução e objetivos

Os camarões do gênero *Macrobrachium* possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em toda extensão da América do Norte, América do Sul e Ásia (Pillay e Kutty, 2005) em águas tropicais e subtropicais (Magalhães, 2000; Meireles et al., 2013). Atualmente existem 287 espécies do gênero reconhecidas como válidas mundialmente (WoRMS, 2018a). Dentre elas, *Macrobrachium pantanalense* é a espécie com maior ocorrência no Pantanal Sul Matogrossense (Hayd e Anger, 2013).

*Macrobrachium pantanalense* é uma espécie endêmica da região pantaneira, sendo facilmente encontrada em todos corpos de água da região (Valenti et al., 2011; Hayd e Anger, 2013). Esta espécie foi descrita recentemente (Dos Santos et al., 2013), sendo que anteriormente os organismos desta espécie encontrados no Pantanal Sul Matogrossense eram considerados (erradamente) como parte da população continental de *Macrobrachium amazonicum* (Anger e Hayd, 2010; Valenti et al., 2011). Contudo, o estudo das suas características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas demonstrou a existência de diferenças significativas entre as populações oriundas do Pantanal e do Pará (Anger et al., 2009; Anger e Hayd, 2010; Charmantier e Anger, 2011; Urzúa e Anger, 2011; Hayd e Anger, 2013; Weiss et al., 2015).

Apesar da descrição de *M. pantanalense* ser recente, esta é uma espécie com potencial para cultivo em águas interiores proporcionando oportunidades de valorização no mercado de iscas vivas e na indústria ornamental (Valenti et al., 2011; Karim et al., 2015). Além disso, por ser uma espécie endêmica, pode ser utilizada como organismo modelo para a realização de bioensaios, nomeadamente em pesquisas relacionadas aos impactos ambientais que ocorrem na região devido ao crescimento da agricultura e pecuária, assim como às mudanças climáticas que tem ocorrido na região do Pantanal Sul Matogrossense (Silio-Calzada et al., 2017; Soares et al., 2017). Uma vez que as informações sobre a biologia, ecologia e cultivo da espécie são ainda escassas, o desenvolvimento de protocolo de cultivo adequado à produção de *M. pantanalense* é fundamental para permitir a manutenção e produção desta espécie em condições laboratoriais.

A salinidade é um fator ambiental importante que pode condicionar a sobrevivência das espécies (Anger, 2001; 2003; Kutty e Valenti, 2010; Lal et al., 2012). Cada espécie apresenta

uma salinidade específica ótima para a sua sobrevivência e desenvolvimento, podendo esta variar ao longo do seu ciclo de vida (Anger, 2001; 2003). Desta forma, o conhecimento da salinidade ideal para o cultivo em laboratório é de grande importância quando se pretende garantir uma produção regular e em grandes quantidades de qualquer organismo aquático. Embora sejam consideradas espécies dulcícolas, os camarões do gênero *Macrobrachium* necessitam, de um modo geral, de salinidade para completarem o seu ciclo larval (Brown et al., 2010; Kutty e Valenti, 2010). A realização de pesquisas relacionadas à salinidade de cultivo, bem como referentes às suas consequências fenotípicas e fisiologias para as espécies do gênero, têm sido amplamente realizadas (Araujo e Valenti, 2010; Kutty e Valenti, 2010; Charmantier e Anger, 2011; Lal et al., 2012). A título de exemplo, *Macrobrachium rosenbergii*, espécie exótica e mundialmente conhecida pelo peso que representa na produção aquícola mundial (FAO, 2014) tem um melhor desempenho de cultivo em salinidade 12 (Uno e Kwon, 1969; Brown et al., 2010). Já as espécies nativas brasileiras, *Macrobrachium acanthurus*, *Macrobrachium carcinus* e *Macrobrachium amazonicum*, que apresentam igualmente um elevado potencial de cultivo (Kutty e Valenti, 2010) registam um melhor desempenho larval em salinidade de 21, 14 e 12 respectivamente (Choudhury, 1970, 1971; Maciel e Valenti, 2009; Kutty e Valenti, 2010). Até à data, não existem ainda estudos referentes à salinidade ideal para o cultivo larval de *M. pantanalense*. Desta forma, tendo em vista a relevância desta informações para o estabelecimento de um protocolo de cultivo em laboratório para esta espécie de camarão carídeo, o presente trabalho testou a seguinte hipótese nula: o desenvolvimento larval e o perfil de ácidos graxos de larvas de *Macrobrachium pantanalense* não variam com a salinidade.

## 2.2.2 - Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carcinologia e Carcinicultura do Cerrado e Pantanal (CARCIPANTA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) em Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil e seguiu as etapas descritas abaixo.

### 2.2.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de *M. pantanalense*

O procedimento metodológico para coleta e manutenção de reprodutores de *M. pantanalense* utilizado neste trabalho foi idêntico ao descrito no item 2.1.2.1.

#### 2.2.2.2 - Cultivo larval

Após a eclosão, foram selecionadas 630 larvas provenientes de 3 eclosões de fêmeas diferentes (comprimento total:  $55,13 \text{ mm} \pm 0,24$  e peso:  $1,0203 \text{ g} \pm 0,03$ ;  $p > 0,05$  para variabilidade intraespecífica). A larvicultura foi realizada individualmente em recipientes de polietileno de 80 mL em câmara de germinação tipo DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio; TE-401, Tecnal,) com fotoperíodo 12:12 (claro:escuro) e temperatura de 28 °C. Os cultivos foram realizados nas salinidades 0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 ( $n = 90$ ). A água utilizada nos cultivos foi obtida por meio da dissolução de sal marinho artificial (Nutrateg) em água destilada previamente preparada e armazenada em DBO. A salinidade da água de cultivo foi conferida diariamente antes do manejo larval por meio de uma sonda multiparâmetro (556 MPS, YSI). O manejo das larvas foi realizado diariamente e consistiu em alimentação das larvas com náuplios recém eclodidos de *Artemia* (3 náuplios/mL), trocas totais de água, observação do desenvolvimento larval e registro da mortalidade. O desenvolvimento larval foi observado por meio de um estereomicroscópio (Opticam HD 3.7). Os estádios larvais sucessivos foram identificados usando a descrição morfológica de desenvolvimento larval de *Macrobrachium amazonicum* (Vega Pérez, 1984), uma vez que a descrição morfológica das larvas de *M. pantanalense* ainda não está disponível. Para evitar a influência da salinidade da água onde foram eclodidos os náuplios de *Artemia* nas condições da larvicultura, os náuplios utilizados foram previamente lavados com água destilada antes de serem fornecidos às larvas em cultivo.

Após a metamorfose, os decapoditos obtidos foram mensurados quanto ao comprimento da carapaça (CC: comprimento da margem pós - orbital à margem médio - posterior dorsal do cefalotórax) (estereomicroscópio Opticam HD 3.7) para obtenção do comprimento total (CT: distância entre a extremidade anterior do rostro à extremidade posterior do telso) por meio da equação:  $CT = 3,4215CC + 2,0269$  (Figura 20). Posteriormente, os decapoditos foram liofilizados para obtenção de peso seco (balança analítica com precisão 0,0001 g Dhaus) e para realização de análises de ácidos graxos.



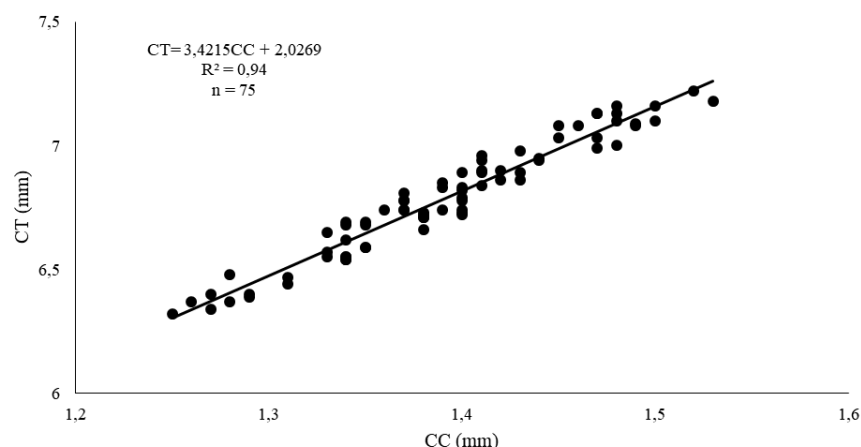


Figura 20 - Regressão linear descrevendo a relação entre comprimento da carapaça (CC) e comprimento total (CT) em decapoditos de *Macrobrachium pantanalense*, oriundos do Pantanal de mato Grosso do Sul, Brasil.

#### 2.2.2.3 - Análise de ácidos graxos

A análise de ácidos graxos (AG) foi realizada com os decapoditos provenientes das salinidades 4, 5 e 6, uma vez que estas possibilitaram melhor desempenho no cultivo. A amostragem para obtenção do perfil de ácidos graxos dos decapoditos foi feita por meio de uma amostra composta com 7 animais de cada salinidade com 3 réplicas cada.

O procedimento metodológico para análise de ácidos graxos utilizado neste trabalho foi idêntico ao descrito no item 2.1.2.2. Os SFA foram definidos pela ausência de instauração, os MUFA presença de 1 insaturação, os PUFA pela presença de  $\geq 2$  dupla ligação e os HUFA pela presença de  $\geq 4$  dupla ligação.

#### 2.2.2.4 - Análise de dados

Em relação aos dados de cultivo larval, foram avaliados as seguintes variáveis dependentes: sobrevivência, duração do desenvolvimento larval (dias), peso (mg) e comprimento total (mm). A matriz de similaridade entre as amostras foi obtida por meio da distância euclidiana, seguindo a transformação de  $\log x+1$ . Os dados obtidos foram comparados por meio de uma análise multivariada permutativa de variância (PERMANOVA) de uma via, considerando a existência de diferenças significativas sempre que  $p < 0,05$ .

Quando foi identificada a existência de diferenças significativas, os diferentes tratamentos (salinidades) foram comparados utilizando um teste do tipo *Pair-wise* ( $p<0,05$ ).

Para os dados de ácidos graxos, a matriz de similaridade foi obtida por meio da determinação do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, seguindo a transformação de  $\log x+1$ . O perfil de ácidos graxos (AG) dos decapoditos obtidos em larvicultura em diferentes salinidade foi igualmente comparado por meio de uma PERMANOVA de uma via e respectivos testes *Pair-wise test* ( $p<0,05$ ). As diferenças nos perfis de AG com mais de 50% de representatividade entre as salinidades foram exploradas por meio da rotina de percentuais de similaridade (SIMPER).

Todos os dados do presente estudo foram analisados estatisticamente com o software Primer 6 com o complemento PERMANOVA (Primer – E Ltd., Plymouth, Reino Unido).

### 2.2.3 - Resultados

As larvas de *Macrobrachium pantanalense* foram afetadas negativamente pela larvicultura em salinidade 0, tendo o cultivo sido ineficaz nesta condição e apresentando uma duração máxima de 16 dias. Nenhuma larva realizou a metamorfose para decapodito, tendo sido o estágio de ZV o estágio mais avançado de desenvolvimento larval observado (Figura 21).

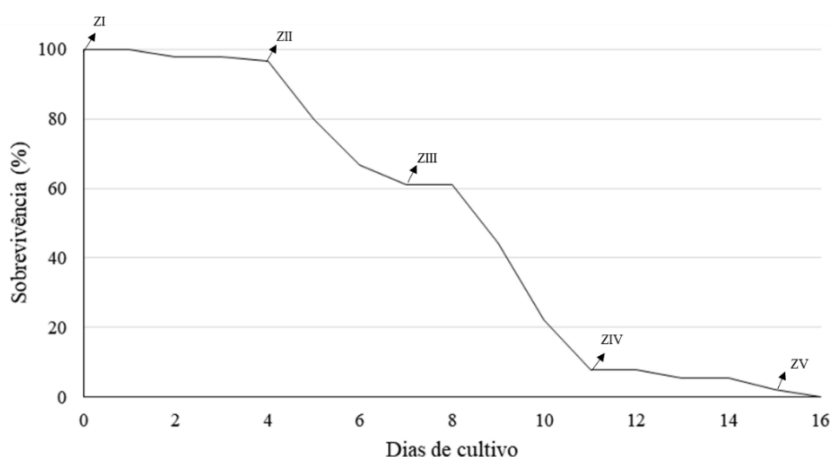


Figura 21 - Larvicultura de *Macrobrachium pantanalense* em salinidade 0. Sobrevivência/estágio larval em dias de cultivo.

Foram observadas diferenças significativas na sobrevivência até à metamorfose entre as diferentes salinidades de cultivo ( $p<0,05$ ) (Figura 22). A salinidade 4 foi mais adequada ao cultivo de *M. pantanalense*, uma vez que 96% dos animais cultivados completaram a metamorfose. A sobrevivência nas salinidade 5 e 6 foram inferiores, de modo que somente 89 e 83% das larvas cultivadas completaram a metamorfose, respectivamente. A redução da salinidade teve um efeito inversamente proporcional à sobrevivência até à metamorfose.

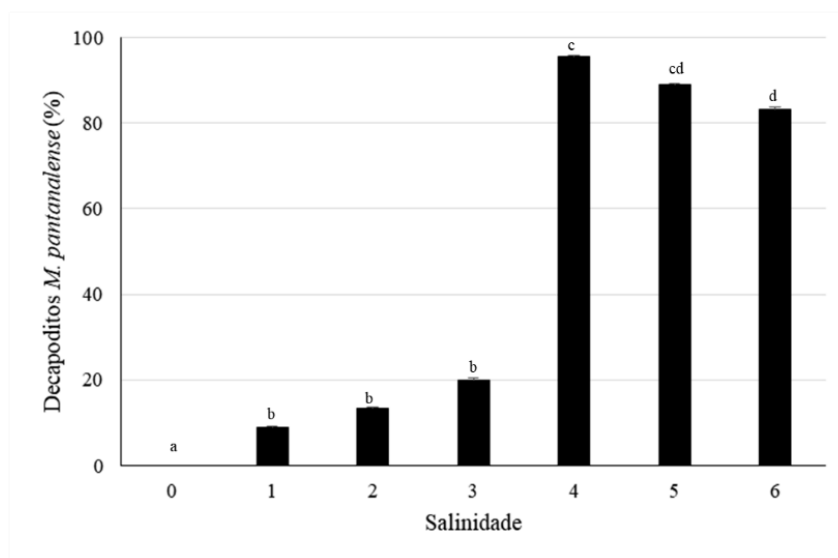


Figura 22 - Percentagem de decapoditos de *Macrobrachium pantanalense* obtidos ao final do cultivo em diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as salinidades de cultivo ( $p<0,05$ ).

Foram igualmente observadas diferenças significativas entre as diferentes salinidades no número de dias de cultivo necessários para as larvas realizarem a metamorfose, assim como no peso seco dos decapoditos ( $p<0,05$ ). Não foram observadas diferenças significativas no comprimento total dos decapoditos ( $p>0,05$ ).

Os resultados obtidos (sintetizados na Tabela 4) demonstram que a larvicultura em salinidade 4 é ideal para o cultivo de *M. pantanalense* em laboratório, produzindo mais decapoditos num menor período de tempo quando comparada às demais salinidades testadas ( $p<0,05$ ). A larvicultura na salinidade 4 apresentou uma duração média de 29 ( $\pm 1,09$ ) dias. A redução da salinidade teve como consequência o prolongamento do ciclo larval, tendo estes apresentado uma duração média de 34 dias em salinidades 1, 2 e 3. O cultivo nas salinidades 5 e 6 apresentaram uma duração média de ciclo larval de 30 dias, embora tenham sido menos eficientes que em salinidade 4.

Os decapoditos obtidos em larvicultura a salinidade 4 apresentaram um peso seco médio 0,794 ( $\pm$  0,14) mg, sendo este significativamente superior ( $p<0,05$ ) aos valores registados nas demais salinidades. Os animais cultivados em salinidade 5 e 6 apresentaram um peso seco médio de 0,777 ( $\pm$  0,13) mg e 0,748 ( $\pm$  0,10) mg, respectivamente. Os animais cultivados nas salinidades 1, 2 e 3 apresentaram pior desempenho com um peso seco médio de 0,631 ( $\pm$  0,06) mg, 0,672 ( $\pm$  0,21) mg e 0,771 ( $\pm$  0,14) mg, respectivamente.

Tabela 4 - Larvicultura de *Macrobrachium pantanalense* em diferentes salinidades: dias de cultivo, comprimento total e peso seco de decapoditos recém metamorfoseados.

|                                   | Salinidade                    |                               |                               |                               |                               |                                |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                   | 1                             | 2                             | 3                             | 4                             | 5                             | 6                              |
| DC Max                            | 40                            | 37                            | 40                            | 31                            | 32                            | 33                             |
| DC média $\pm$ desvio padrão      | 34 $\pm$ 2,95 <sup>d</sup>    | 34 $\pm$ 1,68 <sup>d</sup>    | 34 $\pm$ 2,32 <sup>d</sup>    | 29 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>    | 30 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>    | 30 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>     |
| DC Min                            | 31                            | 31                            | 30                            | 26                            | 27                            | 28                             |
| CT (mm) Max                       | 6,82                          | 7,26                          | 7,26                          | 7,64                          | 7,43                          | 7,23                           |
| CT (mm) média $\pm$ desvio padrão | 6,68 $\pm$ 0,10               | 6,76 $\pm$ 0,23               | 6,84 $\pm$ 0,21               | 6,87 $\pm$ 0,26               | 6,77 $\pm$ 0,27               | 6,79 $\pm$ 0,20                |
| CT (mm) Min                       | 6,51                          | 6,51                          | 6,44                          | 6,27                          | 6,27                          | 6,3                            |
| PS (mg) Max                       | 0,851                         | 0,877                         | 1,121                         | 1,317                         | 1,138                         | 0,961                          |
| PS (mg) média $\pm$ desvio padrão | 0,631 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup> | 0,672 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup> | 0,771 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup> | 0,794 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup> | 0,777 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup> | 0,748 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup> |
| PS (mg) Min                       | 0,586                         | 0,550                         | 0,587                         | 0,371                         | 0,347                         | 0,473                          |

DC: dias de cultivo até metamorfose; CT: comprimento total; PS: peso seco. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as salinidades de cultivo ( $p<0,05$ ).

Foram observados efeitos significativos entre as diferentes salinidades de cultivo no perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *M. pantanalense* ( $p<0,05$ ). A Tabela 5 resume o perfil de AG identificado para os decapoditos dos diferentes tratamentos experimentais. O aumento da salinidade proporcionou uma redução na concentração de AG. A quantidade de AG foi superior nos decapoditos cultivados em salinidade 4 ( $p<0,05$ ), com um total de 75,09 ( $\pm$  12,61)  $\mu$ g AG/mg PS. A concentração total de AG nas salinidades 5 e 6 foi de 57,56 ( $\pm$  10,53)  $\mu$ g AG/ mg PS e 59,18 ( $\pm$  11,30)  $\mu$ g AG/mg PS, respectivamente. Os AG com maior representatividade no perfis identificados foram: 16:0 e 18:0 - SFA, 18:1 $n$ -9 e 18:1 $n$ -7 - MUFA, 22:2 $n$ -6 e 18:2 $n$ -6 - PUFA e 20:5 $n$ -3 e 20:4 $n$ -6 - HUFA. Os AG que contribuíram com >50% para diferenças estatísticas observadas nos perfis identificados estão representados na Tabela 6.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *Macrobrachium pantanalense* cultivados em diferentes salinidades, valores expressos em µg AG/mg de peso seco. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ).

| AG      | Salinidade     |                |                |
|---------|----------------|----------------|----------------|
|         | 4 <sup>a</sup> | 5 <sup>b</sup> | 6 <sup>b</sup> |
| 14:0    | 1,55±0,20      | 1,33±0,14      | 1,36±0,16      |
| 15:0    | 0,83±0,10      | 0,72±0,07      | 0,71±0,08      |
| 16:0    | 10,85±2,37     | 8,09±1,85      | 7,70±1,86      |
| 17:0    | 1,74±0,32      | 1,56±0,29      | 1,39±0,25      |
| 18:0    | 7,53±1,76      | 6,01±1,35      | 5,54±1,45      |
| 20:0    | 1,20±0,11      | 1,11±0,06      | 1,16±0,20      |
| 22:0    | 1,42±0,13      | 1,31±0,10      | 1,46±0,36      |
| ΣSFA    | 25,11±4,46     | 20,12±3,70     | 19,31 ±3,87    |
| 16:1n-9 | 1,03±0,34      | 0,76±0,09      | 0,79±0,1       |
| 16:1n-7 | 2,50±0,56      | 1,70±0,47      | 1,89±0,51      |
| 17:1n-9 | 1,45±0,21      | 1,12±0,20      | 1,18±0,21      |
| 18:1n-9 | 10,04±2,09     | 7,40±2,00      | 7,42±1,99      |
| 18:1n-7 | 7,52±1,64      | 5,38±1,36      | 5,81±1,48      |
| 20:1n-9 | 0,75±0,05      | 0,69±0,03      | 0,70±0,08      |
| ΣMUFA   | 23,28±4,50     | 17,05±4,10     | 17,79±4,21     |
| 18:2n-6 | 3,80±0,99      | 2,41±0,69      | 2,87±0,88      |
| 18:3n-3 | 3,04±0,77      | 1,95±0,48      | 2,43±0,78      |
| 20:2n-6 | 0,78±0,04      | 0,74±0,06      | 0,71±0,05      |
| 22:2n-6 | 3,99±0,09      | 3,90±0,05      | 3,84±0,26      |
| ΣPUFA   | 11,61±1,75     | 8,99±1,20      | 9,85±1,73      |
| 20:4n-6 | 4,28±1,06      | 2,78±0,78      | 3,07±0,80      |
| 20:5n-3 | 6,81±1,72      | 4,09±1,14      | 5,12±1,30      |
| 22:6n-3 | 3,99±0,09      | 4,51±0,32      | 4,02±0,29      |
| ΣHUFA   | 15,08±2,73     | 11,38±1,84     | 12,21±1,98     |
| Total   | 75,09±12,61    | 57,56±10,53    | 59,18±11,30    |

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados.

Tabela 6 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças no perfil de ácidos graxos entre os decapoditos de *Macrobrachium pantanalense* provenientes de larvicultura realizada em diferentes salinidades.

| AG      | Sal. 4 vs Sal. 5 |       | AG      | Sal. 4 vs Sal. 6 |       | AG      | Sal. 5 vs Sal. 6 |       |
|---------|------------------|-------|---------|------------------|-------|---------|------------------|-------|
|         | Contr.%          | Cum.% |         | Contr.%          | Cum.% |         | Contr.%          | Cum.% |
| 20:5n-3 | 11,55            | 11,55 | 20:5n-3 | 11,55            | 11,55 | 18:1n-9 | 10,59            | 10,59 |
| 18:2n-6 | 9,43             | 20,98 | 18:2n-6 | 9,43             | 20,98 | 20:5n-3 | 9,75             | 20,34 |
| 20:4n-6 | 9,29             | 30,27 | 20:4n-6 | 9,29             | 30,27 | 18:1n-7 | 9,30             | 29,63 |
| 18:1n-9 | 8,58             | 38,86 | 18:1n-9 | 8,58             | 38,86 | 16:0    | 8,78             | 38,42 |
| 18:1n-7 | 8,56             | 47,41 | 18:1n-7 | 8,56             | 47,41 | 20:4n-6 | 8,78             | 47,19 |
| 18:3n-3 | 8,40             | 55,81 | 18:3n-3 | 8,40             | 55,81 | 18:2n-6 | 8,72             | 55,92 |

Sal. = salinidade; Crontr. = contribuição da variável ácido graxo; Cum. = contribuição cumulativa.

#### 2.2.4 – Discussão

A salinidade é um fator ambiental importante que condiciona o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos aquáticos (Anger, 2003). Embora seja uma espécie com habitat natural dulcícola (Hayd e Anger, 2013), a larvicultura de *Macrobrachium pantanalense* não pôde ser realizada com sucesso em água doce (Figura 21) em condições laboratoriais. Deste modo, sugere-se que, tal como nas demais espécies do gênero *Macrobrachium* (Ismael e New, 2000; Brown et al., 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010; Charmantier e Anger, 2011), as larvas de *M. pantanalense* necessitam de alguma salinidade para completar seu ciclo larval em sistemas de cultivo.

O desenvolvimento dos crustáceos decápodes é um processo complexo associado à realização de mudas sucessivas com mudanças morfológicas e fisiológicas mais ou menos pronunciadas (Anger, 2001; Hayd et al., 2008; Brown et al., 2010). Embora o ciclo de muda esteja em grande parte sob controle de fatores intrínsecos, os efeitos de fatores extrínsecos como a salinidade podem afetar o regulamento hormonal que medeia este processo (Anger, 2001). Desta forma, a salinidade pode promover a plasticidade fenotípica (Anger, 2001, 2003), sendo comum observar este fenômeno em crustáceos decápodes expostos a ambientes abioticamente desfavoráveis (Lejeusne et al., 2013; Magozzi e Calosi, 2015; Oliphant et al., 2013, 2014). Efetivamente, o presente trabalho permite observar a existência de plasticidade fenotípica pronunciada às salinidades que promoveram um menor desempenho em relação à duração do desenvolvimento larval de *M. pantanalense* (Tabela 4), uma vez que foi possível observar a ocorrência de mudas consecutivas sem alteração do estágio larval, nomeadamente nos estágios mais avançados de desenvolvimento.

Em termos de resposta do metabolismo à salinidade, o gênero *Macrobrachium* pode ser dividido em dois grandes grupos: um primeiro grupo em que os organismos aumentam as taxas metabólicas em meios concentrados ou diluídos; e um segundo grupo em que os organismos diminuem as taxas metabólicas em meios mais concentrados ou diluídos (Moreira et al., 1982). O presente trabalho sugere que *M. pantanalense* pode pertencer ao primeiro grupo, uma vez que o aumento, bem como a redução, da salinidade de cultivo larval teve como consequência a promoção de uma maior ou baixa sobrevivência (Figura 22), um atraso no desenvolvimento larval e redução no peso seco dos decapoditos (Tabela 4). Estas respostas poderão ter sido promovidas pela necessidade metabólica inerente à osmorregulação e

consequente aumento do gasto energético associado a um estresse osmótico (Anger, 2003). Uma vez que muitas espécies de água doce são osmoconformadoras, a demanda de energia aumenta conforme a salinidade para que a pressão osmótica interna se mantenha adequada ao ambiente circundante (Schröder et al., 2015). Tal como no presente trabalho, Charmantier e Anger (2011) observaram um rápido desenvolvimento e uma sobrevivência mais elevada em larvas de *M. pantanalense* expostas a salinidades moderadas (1-5), tendo o aumento da salinidade promovido efeitos deletérios na sobrevivência e ciclo larval (> 5).

Os perfis de ácidos graxos (AG) obtidos neste trabalho para os decapoditos produzidos em laboratório (Tabela 5) corroboram os padrões identificados no desenvolvimento larval e características morfométricas (tamanho e peso) dos decapoditos. A redução nos níveis de AG de acordo com o aumento da salinidade de cultivo, nomeadamente ao nível dos SFA (Tabela 5), poderá ser explicada pelo fato destes AG estarem associados às reservas energéticas nos crustáceos decápodes (Turner et al., 2003; Calado et al., 2007; Urzúa e Anger, 2011) que terão sido catabolizadas para mitigar os efeitos do estresse osmótico ocasionado pelo aumento da salinidade. Importa salientar que o estresse osmótico inerente às salinidades mais altas poderá igualmente ter ocasionado uma redução da atividade alimentar das larvas (Anger, 2003). Os HUFA, principalmente o 20:5 $n$ -3, foram os AG com maior representatividade nas diferenças significativas observadas (Tabela 6). Estes AG são essencialmente obtidos a partir da alimentação fornecida, uma vez que não são sintetizados pelos crustáceos decápodes (D'Abramo e New, 2010; Lima e Figueiredo-Lima, 2016; Romano et al., 2016; Calado, 2017; Olivotto et al., 2017). Adicionalmente, a maior concentração de AG 18:1 $n$ -9 observada nos decapoditos cultivados em salinidade 4 (Tabela 5) pode indicar a existência de um maior consumo de *Artemia* durante o desenvolvimento larval, uma vez que este é um AG é muito abundante em espécies com características predatórias, sendo frequentemente usado para inferir a existência de carnivoría (Kelly e Scheibling, 2012).

As respostas fenotípicas e metabólicas de larvas de crustáceos decápodes sob diferentes condições de salinidade têm sido amplamente estudadas por diversos autores (Giménez e Anger, 2001; Anger, 2001; Maciel e Valenti, 2009; Araujo e Valenti, 2010; Charmantier e Anger, 2011; Lal et al., 2012; Schröder et al., 2015; Hayd et al., 2017;). Estas respostas desempenham um papel fundamental para o conhecimento da ecologia da espécie bem como o seu desempenho em cultivos, tanto a uma escala comercial quanto laboratorial para fins académicos, uma vez que a variabilidade na salinidade de cultivo pode ocasionar danos irreversíveis nos organelos celulares, tecidos e órgãos dos crustáceos (Anger, 2003). Desta forma é evidenciada a grande importância da salinidade no cultivo e manutenção desta

espécie em estudo, sendo possível afirmar que perante os resultados obtidos no presente trabalho é recomendado utilizar uma salinidade de 4 para proceder à larvicultura de *M. pantanalense* em laboratório.



## CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CULTIVO DE *Palaemon varians* EM LABORATÓRIO

### 3.1 – Desenvolvimento larval de *Palaemon varians* exposto a diferentes salinidades e diferentes períodos de inanição após a eclosão

#### 3.1.1 - Introdução e objetivos

A utilização de organismos modelo em bioensaios depende de um fornecimento confiável e regular dos mesmos sempre que necessário (Leal et al., 2016a). Os protocolos de cultivo utilizados devem assim garantir o desenvolvimento das espécies em condições totalmente controladas e uniformes em laboratório (Ankeny e Leonelli, 2011; Leonelli e Ankeny, 2013; Leal et al., 2016a).

Os crustáceos decápodes são conhecidos por sua grande plasticidade a diferentes condições ambientais (Rosa e Nunes, 2002). A existência de alterações mais ou menos pronunciadas no ambiente que ocupam e na sua alimentação podem afetar de forma determinante o seu desenvolvimento larval (Calado et al., 2005b; Rosa et al., 2003, 2005, 2007). Nesse contexto, a salinidade apresenta-se como um fator abiótico que pode influenciar o desenvolvimento e sobrevivência destas espécies, nomeadamente quando associadas a condições tróficas desfavoráveis (Anger, 2001, 2003, Schröder et al., 2015). Embora as larvas de alguns crustáceos decápodes tolerem períodos de inanição mais ou menos prolongados após a sua eclosão, é essencial para a sua sobrevivência ter acesso a uma fonte alimentar exógena que possa suprir qualitativa e quantitativamente as suas necessidades nutricionais. A exposição prolongado a um regime alimentar sub ótimo pode ocasionar danos irreversíveis às larvas (Anger, 2001; Espinoza et al., 2016), levando-as por vezes a atingir um ponto-de-não-retorno (PNR). O PNR é definido como o período em que as larvas que inicialmente passaram fome perdem sua capacidade de recuperação ao estresse nutricional, mesmo após a posterior alimentação. As larvas podem sobreviver por períodos prolongados, contudo perdem a capacidade de realizar ecdises, permanecendo então no mesmo estágio larval até a morte (Anger et al., 1985; Anger e Dawirs, 1981; Anger, 2001; Souza et al., 2017).

*Palaemon varians* é um crustáceo decápode com interesse comercial e acadêmico cuja produção tem sido amplamente estudada em cenários de flutuações de temperatura (Cottin et al., 2012; Raveux et al., 2012), diferentes densidade de cultivo (Palma et al., 2009), diferentes regimes alimentares (Aguzzi et al., 2005), nutrição (Palma et al., 2008), tolerância fisiológica (Oliphant et al., 2011; New et al., 2014) e perante efeitos de plasticidade ambiental (Oliphant et al., 2013, 2014). A plasticidade fenotípica exibida por esta espécie quando sujeita a

diferentes cenários de salinidade e alimentação pode permitir a otimização dos seus protocolos de cultivo, podendo resultar numa maximização da produção e numa eventual redução de custos. Desta forma o presente trabalho testou a seguinte hipótese nula: a salinidade e o número de horas de inanição após a eclosão larval não afetam o desenvolvimento e o perfil de ácidos graxos de larvas de *Palaemon varians*

### 3.1.2 - Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo de Crustáceos Decápodes da Universidade de Aveiro, Portugal e seguiu as etapas descritas abaixo.

#### 3.1.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de *Palaemon varians*

Fêmeas ovígeras em estágio avançado de desenvolvimento embrionário de *Palaemon varians* (Rodríguez et al., 1993) foram coletadas em julho de 2015 na Salina da Troncalhada localizada em Aveiro, Portugal (40°38'40.1"N, 8°39'52.0"W) (Figura 23) e transportadas ao laboratório de cultivo na Universidade de Aveiro. Após a coleta e aclimação, os camarões foram transferidos para o sistema de maturação recirculado descrito por Calado et al. (2007) utilizado no laboratório até a eclosão das larvas (Figura 24). Durante o período de cultivo os crustáceos foram mantidos a uma temperatura de 28 °C, salinidade 35±1, fotoperíodo 12:12 (claro: escuro) e alimentados 4 vezes ao dia com filé de peixe, lula, ração comercial para camarões – 40,5 % PB (Sera®) e alimento congelado para organismos marinhos (Marine Cuisine®) de modo *ad libitum*. As fêmeas foram observadas diariamente para registo da ocorrência de eclosão das larvas.



Figura 23 - Salina da Troncalhada, localizada em Aveiro, Portugal. Local de coleta de fêmeas ovígeras de *Palaemon varians*.



Figura 24 - Sistema de maturação para crustáceos decápodos descrito por Calado et al. (2007c): (a) visão geral do sistema de cultivo; (b) tanques de estabulação de reprodutores.

### 3.2.2.2 - Cultivo larval

Após a eclosão, 630 larvas foram selecionadas e cultivadas individualmente em placas de polietileno com poços de 30 mL cada (Figura 25). O cultivo foi realizado sob um fotoperíodo 12:12 (claro: escuro) e uma temperatura de 26 °C. O delineamento experimental utilizado foi composto por 2 fatores: salinidade e períodos de inanição após a eclosão. Foram utilizados 3 níveis de salinidade (25, 35 e 45) e 7 níveis de inanição após a eclosão (inanição,

0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h). Diariamente foi realizada a alimentação das larvas com náuplios recém eclodidos de *Artemia* (3 náuplios/mL), a troca total da água de cultivo, a observação do desenvolvimento larval bem como a sobrevivência. A identificação dos estágios larvais foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss Stemi DV4) , utilizando a descrição morfológica obtida por Fincham (1979).



Figura 25 - Cultivo individual de larvas de *Palaemon varians* em laboratório.

Após a metamorfose, os decapoditos obtidos foram mensurados quanto o comprimento da carapaça (CC: comprimento da margem pós - orbital à margem médio – posterior dorsal do cefalotórax) (estereomicroscópio Stemi 2000 - C Zeiss) para obtenção do comprimento total (CT: distância entre a extremidade anterior do rostro à extremidade posterior do telso) por meio da equação:  $CT = 1,2561CC + 4,1478$  (Figura 26). Posteriormente os decapoditos foram liofilizados para obtenção de peso seco (balança analítica com precisão 0,0001 g Kern) e para realização das análises de ácidos graxos.

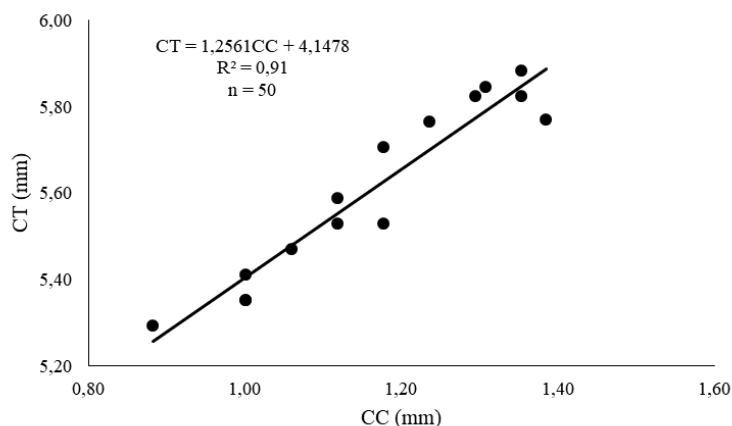


Figura 26 - Regressão linear descrevendo a relação entre comprimento da carapaça (CC) e comprimento total (CT) em decapoditos de *Palaemon varians*.

### 3.2.2.3 - Análise de ácidos graxos

A amostragem para obtenção do perfil de ácidos graxos (AG) dos decapoditos obtidos ao final do cultivo, foi feita por meio de uma amostra composta com 7 exemplares de cada salinidade e cada hora de inanição, com 3 réplicas cada. Os ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) foram obtidos por meio de metilação ácida (adaptado de Christie, 1989). Foram usados 0,5 mg do total da massa de cada amostra composta de decapoditos obtidos em cada tratamento e posteriormente adicionado 1 mL de ácido sulfúrico (2,5%) em metanol. Após incubação a 80 °C, foi adicionado 1 mL de padrão interno (19:0) e 1,5 mL de cloreto de sódio (0,9 %), tendo esta mistura sido agitada no vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. No final foram obtidas duas fases, sendo a fase orgânica (superior) transferida para vials e seca em corrente de nitrogênio. Por fim, as amostras foram re-suspendidas em 700 µL de hexano e 2 µL desta mistura foram injetadas.

Os FAME (Fatty acids methyl esters - Ésteres metilados de ácidos graxos) extraídos das amostras, foram determinados e quantificados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, GC-MS (Shimadzu QP2010 Ultra) equipado com uma coluna (DB-FFAP) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,32 µm de espessura de filme (J&Wscientific). O equipamento GC foi conectado ao detector seletivo de massa (Agilent 5973), operando em modo de impacto de elétrons a 70 eV, digitalizando a faixa m/z 50 – 550 em um ciclo de 1 segundo em modo de varredura. A temperatura do equipamento foi programada a partir de uma temperatura inicial de 80 °C com aumento linear de 25 °C por minuto até 160 °C, 2 °C até 210 °C e 30 °C até 250 °C. A temperatura do injetor e do detector

foram de 220 e 230 °C repectivamente. Foi utilizado gás hélio como transportador em fluxo de 0,5 mL por minuto.

Os picos de AG foram integrados individualmente no software do equipamento e identificados considerando o tempo de retenção e o espectro de massa de cada ácido graxo em relação a uma mistura de padrões injetada anteriormente (C6-C24, Supelco 37 Component Fame Mix). O conteúdo de AG nas amostras analisadas foi calculado considerando a relação entre a massa, a área do AG integrado e o padrão interno (19:0). Os SFA foram definidos pela ausência de instauração, os MUFA presença de 1 insaturação, os PUFA pela presença de  $\geq 2$  dupla ligação e os HUFA pela presença de  $\geq 4$  dupla ligação.

#### 3.2.2.4 - Análise de dados

Em relação aos dados do cultivo larval, foram avaliados os seguintes parâmetros: duração do desenvolvimento larval (dias), peso seco (mg), comprimento total (mm) e sobrevivência até à metamorfose. A matriz de similaridade entre as amostras foi obtida por meio da distância euclidiana, seguindo a transformação de  $\log x+1$ . Os dados obtidos foram comparados por meio de uma PERMANOVA (análise multivariada permutativa de variância) de duas vias considerando  $p<0,05$ . Foram considerados em conjunto os dois fatores de cultivo avaliados no presente estudo: salinidade e período de inanição (com 3 e 7 níveis respectivamente). O fator período de inanição foi aninhado ao fator salinidade. A existência de diferenças significativas entre tratamentos foi avaliada por meio de teste tipo *Pair-wise* ( $p<0,05$ ).

Para os dados de ácidos graxos (AG), a matriz de similaridade entre as amostras foi obtida por meio do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, seguindo a transformação de  $\log x+1$ . Os dados obtidos foram comparados igualmente por meio de uma PERMANOVA de duas vias considerando um nível de significância de  $p<0,05$ . Da mesma foram considerados os dois fatores de cultivo tal como descrito acima, assim como a utilização de teste tipo *Pair-wise* ( $p<0,05$ ) para aferir a existência de diferenças significativas entre tratamentos. As diferenças nos perfis com mais de 50% de representatividade entre as salinidades testadas foram exploradas por meio da rotina de percentuais de similaridade (SIMPER).

A análise de dados foi realizada com o software Primer 6 com o complemento PERMANOVA (Primer – E Ltd., Plymouth, Reino Unido).

### 3.1.3 – Resultados

Foram observados efeitos significativos promovidos pelas diferentes salinidades testadas na sobrevivência das larvas de *Palaemon varians* submetidas à inanição ( $p<0,05$ ) (Figura 27). O cultivo larval teve uma duração máxima de 8 dias nas salinidades de 25 e 35 e de 7 dias na salinidade 45. As larvas cultivadas em salinidade 25 e 35 morreram após atingir o estágio ZIII, enquanto as larvas cultivadas na salinidade 45 não conseguiram desenvolver-se para além do estágio ZII.

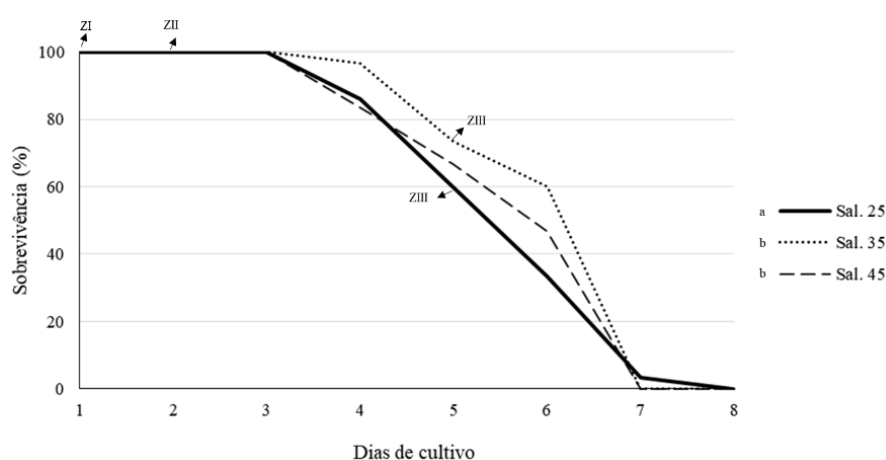


Figura 27 - Sobrevivência larval de *Palaemon varians* submetido à inanição em salinidades de 25, 35 e 45. Sal. = salinidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0,05$ ).

A sobrevivência das larvas no decorrer do cultivo larval foi significativamente superior nas salinidades de 25 e 35 quando comparada à salinidade 45 ( $p<0,05$ ), não tendo sido observados efeitos significativos dos períodos de inanição na sobrevivência dos animais em estudo ( $p>0,05$ ) (Figura 28).



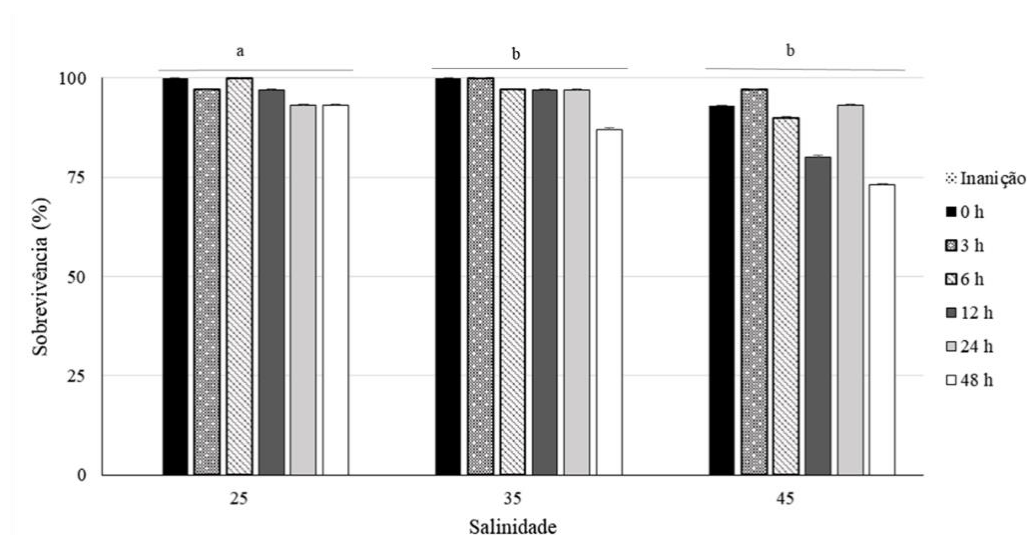


Figura 28 - Sobrevivência (%) de *Palaemon varians* de zoea I à decapodites cultivados a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as salinidades ( $p < 0,05$ ).

Foram registradas diferenças significativas na duração do cultivo larval em função do período de inanição a que foram expostas as larvas de *P. varians* ( $p < 0,05$ ). Efetivamente, as larvas que receberam alimento logo após a eclosão (0 h de inanição), completaram o seu ciclo em apenas 9 dias. O aumento das horas de inanição prolongou o ciclo larval, tendo o efeito mais pronunciado sido registrado nas larvas que receberam alimento somente 48 h após eclosão, uma vez que estas apenas realizaram a metamorfose 11 dias após a eclosão (Figura 29).

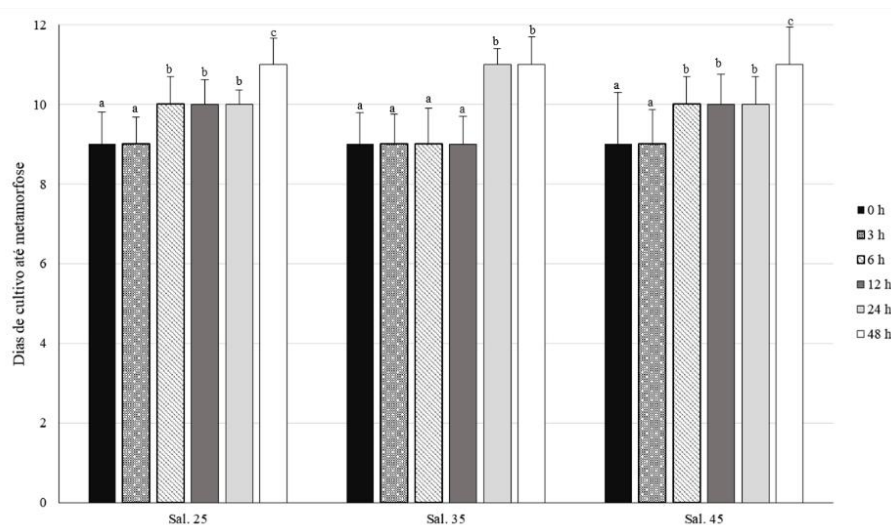


Figura 29 - Desenvolvimento larval de *Palaemon varians* cultivados a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Sal. = salinidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos de inanição ( $p < 0,05$ ).

diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de inanição dentro das salinidades ( $p<0,05$ ).

Não foram observadas diferenças significativas promovidas pelo cultivo a diferentes salinidades no comprimento total (CT) e no peso seco (PS) dos decapoditos obtidos ao final do cultivo ( $p>0,05$ ). No entanto, foram observadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ) no CT e no peso seco promovidas pelos períodos de inanição a que as larvas de *P. varians* foram expostas. A Tabela 7 resume os resultados obtidos relativamente às características exibidas pelos decapoditos cultivados. Os resultados obtidos demonstram que os animais que receberam alimento logo após a eclosão (0 h) tiveram um melhor desempenho e apresentaram maiores CT e PS que os decapoditos obtidos a partir de larvas expostas a períodos de inanição. Da mesma forma, o pior desempenho foi observado nos decapoditos provenientes de larvicultura em que as larvas foram expostas a 48 h de inanição.

Tabela 7 - Comprimento total (CT) e peso seco (PS) de decapoditos recém metamorfoseados de *Palaemon varians* durante o cultivo a diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de inanição dentro das salinidades ( $p<0,05$ ).

| Salinidade 25               |                         |                            |                           |                          |                          |                         |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| h inanição                  | 0                       | 3                          | 6                         | 12                       | 24                       | 48                      |
| CT (mm) max                 | 6,14                    | 5,70                       | 5,70                      | 5,63                     | 5,55                     | 5,55                    |
| CT (mm) média±desvio padrão | 5,48±0,24 <sup>a</sup>  | 5,33±0,15 <sup>b</sup>     | 5,37±0,13 <sup>abc</sup>  | 5,43±0,11 <sup>a</sup>   | 5,39±0,14 <sup>c</sup>   | 5,34±0,12 <sup>d</sup>  |
| CT (mm) min                 | 4,96                    | 5,03                       | 5,11                      | 5,26                     | 5,11                     | 5,11                    |
| PS (mg) max                 | 0,590                   | 0,570                      | 0,670                     | 0,590                    | 0,630                    | 0,560                   |
| PS (mg) média±desvio padrão | 0,526±0,04 <sup>a</sup> | 0,507±0,03 <sup>ab</sup>   | 0,504±0,06 <sup>abc</sup> | 0,498±0,05 <sup>bc</sup> | 0,485±0,05 <sup>c</sup>  | 0,447±0,06 <sup>d</sup> |
| PS (mg) min                 | 0,400                   | 0,430                      | 0,260                     | 0,410                    | 0,410                    | 0,290                   |
| Salinidade 35               |                         |                            |                           |                          |                          |                         |
| h inanição                  | 0                       | 3                          | 6                         | 12                       | 24                       | 48                      |
| CT (mm) max                 | 5,63                    | 6,07                       | 5,77                      | 5,63                     | 5,63                     | 5,63                    |
| CT (mm) média±desvio padrão | 5,57±0,11 <sup>a</sup>  | 5,46±0,16 <sup>bc</sup>    | 5,46±0,29 <sup>bc</sup>   | 5,41±0,10 <sup>cd</sup>  | 5,44±0,12 <sup>e</sup>   | 5,37±0,11 <sup>f</sup>  |
| CT (mm) min                 | 5,18                    | 5,33                       | 5,26                      | 5,26                     | 5,18                     | 5,26                    |
| PS (mg) max                 | 0,750                   | 0,660                      | 0,690                     | 0,640                    | 0,600                    | 0,590                   |
| PS (mg) média±desvio padrão | 0,567±0,05 <sup>a</sup> | 0,544±0,07 <sup>abcd</sup> | 0,527±0,05 <sup>bcd</sup> | 0,520±0,06 <sup>cd</sup> | 0,512±0,06 <sup>d</sup>  | 0,425±0,07 <sup>e</sup> |
| PS (mg) min                 | 0,420                   | 0,360                      | 0,230                     | 0,390                    | 0,290                    | 0,280                   |
| Salinidade 45               |                         |                            |                           |                          |                          |                         |
| h inanição                  | 0                       | 3                          | 6                         | 12                       | 24                       | 48                      |
| CT (mm) max                 | 5,85                    | 5,63                       | 5,63                      | 5,55                     | 6,00                     | 5,70                    |
| CT (mm) média±desvio padrão | 5,39±0,12 <sup>a</sup>  | 5,39±0,11 <sup>a</sup>     | 5,35±0,09 <sup>bc</sup>   | 5,35±0,11 <sup>c</sup>   | 5,29±0,17 <sup>de</sup>  | 5,28±0,27 <sup>e</sup>  |
| CT (mm) min                 | 5,26                    | 5,26                       | 5,26                      | 5,26                     | 5,26                     | 4,15                    |
| PS (mg) max                 | 0,640                   | 0,640                      | 0,600                     | 0,760                    | 0,650                    | 0,460                   |
| PS (mg) média±desvio padrão | 0,549±0,04 <sup>a</sup> | 0,526±0,04 <sup>a</sup>    | 0,491±0,07 <sup>bc</sup>  | 0,470±0,08 <sup>c</sup>  | 0,426±0,06 <sup>de</sup> | 0,400±0,02 <sup>e</sup> |
| PS (mg) min                 | 0,430                   | 0,420                      | 0,350                     | 0,370                    | 0,400                    | 0,340                   |

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *P. varians* promovidas pela exposição a diferentes salinidades durante o cultivo larval, assim como pela exposição a diferentes períodos de inanição após a eclosão. As Tabelas 8, 9 e 10 resumem o perfil de AG dos decapoditos cultivados nas salinidades 25, 35 e 45, respectivamente. Os animais cultivados em salinidade 25 e 35 apresentaram perfil de AG semelhante ( $p > 0,05$ ) mas significativamente diferente daquele registrado para os decapoditos produzidos a uma salinidade de 45 ( $p < 0,05$ ). Os AG responsáveis por >50% das diferenças significativas registradas no fator salinidade foram os seguintes: 18:3n-6, 20:5n-3, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:3n-3 (Tabela 11).

Na salinidade 25 o perfil de AG (Tabela 8) dos decapoditos foi semelhante após 0, 3, 6, 12, e 24 horas de inanição, diferindo apenas quando as larvas foram expostas a 48 horas de inanição, uma vez que os decapoditos apresentaram uma concentração total de AG superior às demais. De modo que os AG com maiores representatividade foram: 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 22:2n-6 e 22:6n-3. Na salinidade 35 a exposição a 0, 3, e 6 de inanição não promoveu diferenças no perfil de AG (Tabela 9) dos decapoditos, assim como aqueles que foram expostos a 12 e 24 horas de inanição também não diferiram no seu perfil de AG; no entanto, todos os tratamentos diferiram do perfil de AG apresentado pelos decapoditos obtidos a partir de larvas expostas também 48 horas de inanição após a eclosão (apresentando estes últimos uma maior concentração de AG). As maiores concentrações foram observadas para os AG: 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 22:2n-6 e 22:6n-3. Por fim, na salinidade 45 o perfil de AG registrado (Tabela 10) para os decapoditos obtidos de larvas expostas a 0, 3, 24 e 48 horas de inanição foi semelhante entre si, diferindo do perfil em AG registrado para os decapoditos produzidos a partir de larvas expostas a 6 ou 12 horas de inanição. Os AG com maiores concentrações observadas foram: 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:5n-3 e 22:6n-3.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *Palaemon varians* recém metamorfoseados cultivados em salinidade 25 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em µg AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p<0,05$ ).

| AG      | Salinidade 25    |                  |                  |                   |                   |                   |
|---------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         | 0 h <sup>a</sup> | 3 h <sup>a</sup> | 6 h <sup>a</sup> | 12 h <sup>a</sup> | 24 h <sup>a</sup> | 48 h <sup>b</sup> |
| 14:0    | 1,06±0,05        | 1,03±0,02        | 1,07±0,03        | 1,08±0,08         | 1,06 ±0,01        | 2,90±0,45         |
| 15:0    | 0,51±0,02        | 0,50±0,01        | 0,51±0,01        | 0,51±0,03         | 0,50±0,01         | 0,57±0,05         |
| 16:0    | 3,90±1,01        | 3,29±0,62        | 3,70±0,67        | 4,96±0,60         | 3,58±0,30         | 3,87±0,01         |
| 17:0    | 0,62±0,07        | 0,56±0,06        | 0,58±0,06        | 0,58±0,09         | 0,58±0,02         | 1,42±0,50         |
| 18:0    | 3,06±0,72        | 2,64±0,64        | 2,85±0,48        | 4,43±0,61         | 3,01±0,24         | 3,28±0,41         |
| 20:0    | 1,00±0,05        | 0,98±0,04        | 0,99±0,04        | 1,03±0,05         | 1,01±0,03         | 1,36±0,45         |
| 22:0    | 1,08±0,06        | 1,06±0,04        | 1,08±0,05        | 1,09±0,06         | 1,09±0,02         | 1,25±0,15         |
| Σ SFA   | 11,23±1,93       | 10,07±1,41       | 10,79±1,30       | 13,68±1,46        | 10,84±0,61        | 14,28±0,63        |
| 16:1n-9 | 0,56±0,01        | 0,55±0,01        | 0,56±0,01        | 0,56±0,01         | 0,55±0,01         | 0,59±0,04         |
| 16:1n-7 | 0,58±0,02        | 0,57±0,02        | 0,58±0,02        | 0,59±0,03         | 0,58±0,01         | 0,69±0,14         |
| 17:1n-9 | 0,60±0,01        | 0,59±0,02        | 0,59±0,03        | 0,58±0,03         | 0,60±0,01         | 0,65±0,10         |
| 18:1n-9 | 2,33±0,34        | 2,19±0,55        | 2,22±0,55        | 2,53±0,70         | 2,41±0,18         | 5,31±0,88         |
| 18:1n-7 | 1,71± 0,15       | 1,66±0,19        | 1,67±0,13        | 1,74±0,19         | 1,69±0,06         | 2,01±0,15         |
| 20:1n-9 | 0,67±0,01        | 0,65±0,02        | 0,65±0,02        | 0,68±0,04         | 0,68±0,02         | 0,53±0,18         |
| Σ MUFA  | 6,45±0,51        | 6,22±0,8         | 6,27±0,71        | 6,68±0,97         | 6,50±0,28         | 9,77±1,19         |
| 18:2n-6 | 0,53±0,02        | 0,53±0,05        | 0,54±0,04        | 0,59±0,10         | 0,54±0,01         | 3,46±1,51         |
| 18:3n-6 | -                | -                | -                | -                 | -                 | -                 |
| 18:3n-3 | 0,74±0,08        | 0,71±0,14        | 0,70±0,11        | 0,79±0,16         | 0,71±0,04         | 0,83±0,16         |
| 20:2n-6 | -                | -                | -                | -                 | -                 | -                 |
| 20:3n-3 | -                | -                | -                | -                 | -                 | -                 |
| 22:2n-6 | 1,05±0,12        | 1,02±0,07        | 1,04±0,10        | 0,95±0,11         | 0,92±0,07         | 1,16±0,22         |
| Σ PUFA  | 2,31±0,03        | 2,26±0,23        | 2,27±0,25        | 2,33±0,24         | 2,17±0,13         | 5,45±1,58         |
| 18:4n-3 | 0,58±0,05        | 0,55±0,03        | 0,57±0,04        | 0,56±0,05         | 0,59±0,03         | 0,64±0,07         |
| 20:4n-6 | 0,63 0,06        | 0,67±0,17        | 0,63±0,09        | 0,74±0,22         | 0,68±0,08         | 1,00±0,49         |
| 20:5n-3 | 0,74±0,07        | 0,71±0,09        | 0,71±0,05        | 0,72±0,06         | 0,72±0,02         | 0,80±0,04         |
| 22:6n-3 | 4,28±0,07        | 4,16±0,10        | 4,13±0,01        | 4,22±0,14         | 4,32±0,12         | 4,60±0,36         |
| Σ HUFA  | 6,23±0,18        | 6,09±0,36        | 6,04±0,10        | 6,25±0,47         | 6,31±0,09         | 7,03±0,90         |
| Total   | 26,22±2,58       | 24,63±2,76       | 25,38±2,27       | 28,94±2,77        | 25,82±0,89        | 38,02±5,40        |

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados.

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *Palaemon varians* recém metamorfoseados cultivados em salinidade 35 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em  $\mu\text{g}$  AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p < 0,05$ ).

| AG            | Salinidade 35    |                  |                  |                   |                    |                   |
|---------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|               | 0 h <sup>a</sup> | 3 h <sup>a</sup> | 6 h <sup>a</sup> | 12 h <sup>b</sup> | 24 h <sup>bc</sup> | 48 h <sup>d</sup> |
| 14:0          | 1,08±0,02        | 1,10±0,08        | 1,11±0,05        | 1,17±0,09         | 1,21±0,03          | 1,29±0,10         |
| 15:0          | 0,52±0,01        | 0,54±0,04        | 0,53±0,02        | 0,56±0,03         | 0,56±0,03          | 0,58±0,04         |
| 16:0          | 4,46±0,42        | 4,80±1,34        | 6,03±3,00        | 7,03±1,99         | 6,99±0,92          | 9,80±0,74         |
| 17:0          | 0,64±0,03        | 0,68±0,09        | 0,64±0,06        | 0,80±0,09         | 0,84±0,10          | 0,84±0,15         |
| 18:0          | 3,46±0,18        | 3,58±0,57        | 4,50±2,11        | 5,05±1,26         | 4,85±0,58          | 5,27±1,63         |
| 20:0          | 1,03±0,02        | 1,03±0,02        | 1,04±0,05        | 1,10±0,06         | 1,08±0,02          | 1,04±0,01         |
| 22:0          | 1,13±0,03        | 1,13±0,02        | 1,11±0,01        | 1,19±0,05         | 1,16±0,03          | 1,09±0,05         |
| $\Sigma$ SFA  | 12,32±0,58       | 12,86±2,10       | 12,28±0,87       | 16,91±3,51        | 16,71±1,70         | 19,91±2,43        |
| 16:1n-9       | 0,56±0,01        | 0,56±0,02        | 0,56±0,01        | 0,58±0,02         | 0,58±0,01          | 0,74±0,15         |
| 16:1n-7       | 0,59±0,01        | 0,58±0,02        | 0,59±0,04        | 0,62±0,03         | 0,66±0,05          | 0,93±0,26         |
| 17:1n-9       | 0,57±0,01        | 0,62±0,01        | 0,57±0,01        | 0,60±0,04         | 0,59±0,03          | 0,71±0,07         |
| 18:1n-9       | 2,59±0,38        | 2,52±0,48        | 2,39±0,21        | 3,47±0,79         | 3,35±0,35          | 9,45±0,57         |
| 18:1n-7       | 1,77±0,15        | 1,75±0,16        | 1,70±0,09        | 2,03±0,17         | 2,13±0,09          | 6,05±0,35         |
| 20:1n-9       | 0,68±0,03        | 0,70±0,03        | 0,67±0,02        | 0,73±0,06         | 0,73±0,02          | 0,84±0,13         |
| $\Sigma$ MUFA | 6,76±0,56        | 6,75±0,70        | 6,48±0,36        | 8,03±1,04         | 8,03±0,49          | 18,72±1,06        |
| 18:2n-6       | 0,59±0,05        | 0,55±0,04        | 0,53±0,03        | 0,64±0,04         | 0,60±0,02          | 2,72±0,22         |
| 18:3n-6       | -                | -                | -                | -                 | -                  | -                 |
| 18:3n-3       | 0,81±0,16        | 0,77±0,14        | 0,75±0,09        | 1,08±0,08         | 0,92±0,09          | 9,86±0,91         |
| 20:2n-6       | -                | -                | -                | -                 | 0,74±0,01          | 0,81±0,09         |
| 20:3n-3       | -                | -                | -                | -                 | -                  | 0,92±0,06         |
| 22:2n-6       | 1,01±0,07        | 0,87±0,07        | 0,80±0,08        | 0,79±0,01         | 0,80±0,02          | 0,91±0,03         |
| $\Sigma$ PUFA | 2,41±0,27        | 2,18±0,13        | 2,08±0,11        | 2,52±0,10         | 3,07±0,09          | 15,22±1,16        |
| 18:4n-3       | 0,59±0,03        | 0,62±0,07        | 0,57±0,03        | 0,66±0,05         | 0,70±0,01          | -                 |
| 20:4n-6       | 0,70±0,03        | 0,77±0,16        | 0,68±0,16        | 0,86±0,18         | 0,74±0,17          | 1,43±0,66         |
| 20:5n-3       | 0,73±0,01        | 0,74±0,06        | 0,73±0,03        | 0,86±0,09         | 0,86±0,04          | 7,50±0,41         |
| 22:6n-3       | 4,36±0,12        | 4,34±0,06        | 4,24±0,14        | 4,52±0,10         | 4,55±0,10          | 4,49±0,43         |
| $\Sigma$ HUFA | 6,38±0,09        | 6,47±0,14        | 6,22±0,34        | 6,91±0,27         | 6,85±0,28          | 13,42±0,25        |
| Total         | 27,87±1,40       | 28,26±2,99       | 29,73±5,83       | 34,37±4,77        | 34,66±2,51         | 67,28±4,29        |

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados.

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos (AG) de decapoditos de *Palaemon varians* recém metamorfoseados cultivados em salinidade 45 submetidos a diferentes períodos de inanição após a eclosão. Valores expressos em µg AG/ mg de peso seco. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de inanição aninhados à salinidade ( $p < 0,05$ ).

| AG      | Salinidade 45    |                  |                  |                   |                   |                   |
|---------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         | 0 h <sup>a</sup> | 3 h <sup>a</sup> | 6 h <sup>b</sup> | 12 h <sup>c</sup> | 24 h <sup>a</sup> | 48 h <sup>a</sup> |
| 14:0    | 1,24±0,10        | 1,17±0,13        | 1,78±0,67        | 1,22±0,07         | 1,46±0,09         | 1,21±0,10         |
| 15:0    | 0,56±0,03        | 0,55±0,05        | 0,64±0,04        | 0,57±0,05         | 0,65±0,04         | 0,56±0,05         |
| 16:0    | 7,00±1,94        | 4,60±1,07        | 10,36±1,79       | 6,38±1,64         | 9,91±1,23         | 4,82±1,25         |
| 17:0    | 0,72±0,15        | 0,73±0,20        | 0,99±0,12        | 0,78±0,10         | 0,99±0,03         | 0,85±0,32         |
| 18:0    | 4,60±1,20        | 3,50±0,66        | 5,83±0,16        | 4,40±0,94         | 6,55±0,76         | 3,34±0,77         |
| 20:0    | 1,08±0,06        | 1,10±0,09        | 1,42±0,38        | 1,12±0,07         | 1,26±0,03         | 1,07±0,09         |
| 22:0    | 1,25±0,10        | 1,24±0,17        | 1,46±0,12        | 1,25±0,12         | 1,38±0,08         | 1,24±0,27         |
| Σ SFA   | 16,46±3,59       | 12,89±2,04       | 22,49±3,10       | 15,70±2,97        | 22,21±2,14        | 13,08±2,42        |
| 16:1n-9 | 0,70±0,05        | 0,66±0,09        | 0,88±0,08        | 0,64±0,10         | 0,74±0,09         | 0,75±0,16         |
| 16:1n-7 | 0,86±0,12        | 0,75±0,17        | 1,22±0,14        | 0,73±0,16         | 0,90±0,23         | 0,88±0,29         |
| 17:1n-9 | 0,68±0,05        | 0,67±0,09        | 0,74±0,05        | 0,65±0,05         | 0,65±0,04         | 0,66±0,08         |
| 18:1n-9 | 6,66±2,04        | 4,00±0,71        | 12,26±1,61       | 3,42±0,45         | 9,69±0,45         | 4,79±0,99         |
| 18:1n-7 | 4,10±1,04        | 2,77±0,30        | 6,03±0,47        | 2,10±0,95         | 5,35±0,17         | 3,02±0,42         |
| 20:1n-9 | 0,71±0,03        | 0,67±0,06        | 0,84±0,04        | 0,80±0,18         | 1,05±0,44         | 0,80±0,14         |
| Σ MUFA  | 13,70±3,32       | 9,52±1,16        | 21,99±2,11       | 8,33±0,33         | 18,63±0,66        | 10,89±1,75        |
| 18:2n-6 | 2,02±0,60        | 1,67±0,89        | 3,50±0,34        | 1,25±0,95         | 2,18±0,98         | 1,41±0,22         |
| 18:3n-6 | -                | -                | 0,74 ±0,01       | 0,76±0,01         | 0,79±0,04         | 0,83±0,33         |
| 18:3n-3 | 4,86±0,35        | 2,92±0,46        | 14,43±2,14       | 1,14±0,98         | 9,36±0,06         | 4,43±1,05         |
| 20:2n-6 | 0,72±0,03        | 0,71±0,06        | 1,23±0,74        | 0,83±0,08         | 0,84±0,15         | 0,90±0,35         |
| 20:3n-3 | 0,78±0,16        | 0,71±0,30        | 1,17±0,11        | 0,88±0,01         | 0,86±0,23         | 0,80±0,35         |
| 22:2n-6 | 0,88±0,05        | 0,84±0,11        | 1,12±0,23        | 0,92±0,05         | 0,98±0,10         | 0,92±0,15         |
| Σ PUFA  | 11,27±3,01       | 6,86±1,50        | 22,19±2,73       | 5,77±0,93         | 15,01±1,13        | 9,28±0,96         |
| 18:4n-3 | -                | -                | -                | -                 | -                 | -                 |
| 20:4n-6 | 1,32±0,39        | 1,22±0,78        | 2,18±0,56        | 1,02±0,48         | 1,55±0,36         | 1,39±0,67         |
| 20:5n-3 | 4,42±1,67        | 2,79 ±0,19       | 5,65±0,86        | 1,18±0,22         | 6,07±0,08         | 2,80±0,64         |
| 22:6n-3 | 4,00±0,18        | 4,32±0,37        | 4,20±0,12        | 4,82±0,26         | 4,58±0,69         | 5,14±1,92         |
| Σ HUFA  | 9,73±2,01        | 8,33±1,22        | 12,03±0,44       | 7,02±0,36         | 12,021±0,31       | 9,32±2,73         |
| Total   | 51,16±11,89      | 39,40±7,83       | 78,70±6,35       | 36,83±4,52        | 67,81±3,24        | 42,69±6,98        |

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados.

Tabela 11 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças significativas no perfil de ácidos graxos de decapóditos de *Palaemon varians* recém metamorfoseados expostos a diferentes salinidades durante a larvicultura.

| Salinidades | 25 vs 35 |       | 25 vs 45 |         |       | 35 vs 45 |         |       |
|-------------|----------|-------|----------|---------|-------|----------|---------|-------|
| AG          | Contr.%  | Cum.% | AG       | Contr.% | Cum.% | AG       | Contr.% | Cum.% |
| 16:0        | 14,73    | 14,73 | 18:3n-6  | 14,96   | 14,96 | 18:3n-6  | 14,96   | 14,96 |
| 18:0        | 13,76    | 28,49 | 20:5n-3  | 12,11   | 27,07 | 20:5n-3  | 12,11   | 27,07 |
| 18:1n-9     | 11,36    | 39,85 | 18:1n-9  | 8,81    | 35,88 | 18:1n-9  | 8,81    | 35,88 |
| 20:4n-6     | 11,14    | 50,99 | 18:2n-6  | 7,80    | 43,68 | 18:2n-6  | 7,80    | 43,68 |
|             |          |       | 20:3n-3  | 7,43    | 51,12 | 20:3n-3  | 7,43    | 51,12 |

Crontr. = contribuição da variável ácido graxo; Cum. = contribuição cumulativa.

### 3.1.4 – Discussão

O camarão carídeo *Palaemon varians* tem sido amplamente utilizado como espécie modelo em bioensaios realizados para diversas aplicações (Palma et al., 2008; Pavlaki et al., 2016; Rainbow e Smith, 2013). O presente trabalho fornece informações sobre a resposta larval de *P. varians* quando cultivado em laboratório sob diferentes salinidades e expostos a diferentes períodos de inanição após a eclosão, permitindo assim a otimização dos protocolos existentes para cultivo laboratorial.

A salinidade é um fator ambiental importante que pode condicionar a sobrevivência das espécies. (Anger, 2001; 2003). *P. varians* é uma espécie com características euralina, sendo capaz de se desenvolver em salinidades que variam entre 0,9 – 45 (Lofts, 1956; Dolmen et al., 2004; Cottin et al., 2010; New et al., 2014). Embora tenha grande capacidade de osmorregulação, os resultados obtidos sugerem que o aumento da salinidade de cultivo tem efeitos negativos nos estágios larvares de *P. varians*. Efetivamente, este efeito é perfeitamente perceptível quando as larvas são privadas de alimento durante toda a sua vida larval (Figura 27), o que acaba inevitavelmente com a sua morte. No entanto, o aumento do consumo energético inerente aos custos fisiológicos de osmorregulação associados ao desenvolvimento a uma salinidade mais elevada traduz-se num menor período de vida e na incapacidade de avançar para além do estado larval de ZII.

Devido às suas características euralinas, o desenvolvimento larval de *P. varians* foi menos influenciado pela salinidade (Figura 28) quando exposto a uma privação não permanente de alimento. Anger e Spindler (1987) relataram que a inanição inicial em

crustáceos decápodos seguida da alimentação tem como consequência um atraso no ciclo de muda tornando a duração do cultivo larval mais longo. A plasticidade fenotípica de *P. varians* em relação à inanição também foi observada por Oliphant, (2013). O fato de *P. varians* ser uma espécie que apresenta lecitotrofia primária facultativa (Oliphant, 2013) foi confirmado pela ingestão imediatamente após a eclosão de náuplios de *Artemia* em ZI. Embora as larvas desta espécie consigam sobreviver se expostas a períodos não muito prolongados de inanição, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a oferta de alimento logo nas primeiras horas após a eclosão permitem obter um desenvolvimento larval mais rápido (Figura 29). Efetivamente, uma vez que as larvas não tem a necessidade de mobilizar as suas reservas energéticas para sobreviver estas poderão canalizar essas mesmas reservas para a morfogênese e o crescimento somático evitando atrasos significativos no seu desenvolvimento larval (Anger, 2001; Calado et al., 2005a).

O desempenho de *P. varians* não foi influenciado pela salinidade (Tabela 7), devido sua natureza euralina, entretanto os resultados obtidos sugerem que o aumento da salinidade ocasiona menor crescimento e acúmulo de biomassa nos decapoditos, haja visto que os animais cultivados em salinidade mais elevada apresentaram desempenho menor que os decapoditos obtidos em salinidade menores. Este fato pode estar associado ao estresse osmótico ocasionado pela necessidade de osmorregulação (Anger, 2001, 2003; Romano e Zeng, 2012). Contudo, os resultados obtidos (Tabela 7) demonstram que os animais que não passaram por um período de inanição tiveram um melhor desempenho que os demais, uma vez que as suas reservas energéticas não foram mobilizadas para sobrevivência, favorecendo assim o crescimento somático e o consequente aumento de biomassa (Zhang et al., 2014).

Os mecanismos utilizados para a osmorregulação nos crustáceos decápodes estão fortemente associados à fluidez das suas membrana (Morris et al., 1982). A adaptação a condições contrastantes de salinidade tem como consequência a alteração na composição de ácidos graxos (AG) e na fluidez das membranas celulares (Frolov et al., 1991; Romano e Zeng, 2012). No presente trabalho o perfil de AG dos decapoditos refletiu o efeito da salinidade (Tabela 8, 9 e 10), principalmente ao nível dos PUFA e HUFA (Tabela 11). Este resultado está de acordo com o fato destes AG estarem diretamente envolvidos na maior fluidez das membranas celulares registradas em cenários de salinidades subótimas (Frolov et al., 1991; Glencross, 2009; Romano e Zeng, 2012).

Os resultados obtidos demonstraram que o aumento das horas de inanição tem como consequência o incremento das reservas energéticas (Tabelas 8, 9 e 10). Sugerindo assim, que o período de fome que as larvas passaram durante a larvicultura teve como resposta o



incremento de ácidos graxos envolvidos no processo de obtenção de energia como os SFA e MUFA (Nates e McKenney, 2000; Yao et al., 2006; Calado et al., 2007; Rosa et al., 2007) para que no futuro estes AG sejam metabolizados e utilizados como fonte de energia em períodos de escassez de alimento. Nesse contexto Johnston et al., (2004) observaram a redução da utilização dos lipídios durante a inanição em crustáceos decápodes, sugerindo assim, que estes possam ser catabolizados em uma fase de desenvolvimento posterior.

O aumento das concentrações de PUFA e HUFA no maior período de inanição com posterior oferta de alimento (Tabelas 8, 9 e 10) sugerem uma provável maior ingestão de alimento, muito provavelmente para suprir as necessidade metabólicas inerentes à inanição a que foram expostos inicialmente. Quando expostos à inanição, os crustáceos decápodes tendem a preservar os AG  $n-3$  e  $n-9$  (Glencross, 2009), explicando assim as elevadas concentrações de  $18:1n-9$  (abundante em espécies com hábitos carnívoros) (Kelly e Scheibling, 2012) e de  $20:5n-3$  (AG abundante em náuplios de *Artemia*) (Støttrup e McEvoy, 2003; Olivotto et al., 2017). Do mesmo modo, não foi observado qualquer alimento não ingerido nos cultivos larvares realizados nessas condições, embora a quantidade de alimento fornecido tenha sido idêntica em todas os tratamentos.

Os efeitos deletérios da inanição em crustáceos decápodes têm sido amplamente reportados (Anger, 2001; Sánchez-Paz et al., 2006; Calado et al., 2007; Oliphant et al., 2014; Zhang et al., 2014; Espinoza et al., 2016; Ding et al., 2017; Souza et al., 2017). No entanto, vários protocolos de cultivo de crustáceos decápodes sugerem fornecer alimento às larvas somente em ZII, pelo fato das larvas recém eclodidas apresentarem lecitotrofia primária facultativa e, deste modo, ser possível reduzir os custos com o fornecimento de *Artemia* (Dhont et al., 2010; Kutty e Valenti, 2010; Moraes-Valenti e Valenti, 2010). Contudo, Calado et al., (2007) sugerem minimizar os períodos de inanição em crustáceos decápodes imediatamente após a eclosão devido às consequências negativas associadas ao desenvolvimento destas espécies. Da mesma forma os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância da alimentação nas fases iniciais do desenvolvimento, face ao melhor desempenho e condição exibido pelos decapoditos alimentados logo após a eclosão.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho permitem proceder uma otimização dos protocolos de cultivo para *P. varians*. Efetivamente, a realização da sua larvicultura a uma salinidade 35, assim como com o início da alimentação exógena imediatamente após a eclosão, promove uma maior taxa de sobrevivência à metamorfose num menor intervalo de tempo, assim como um desempenho superior em termos de tamanho e de peso dos decapoditos.

### 3.2 – Desempenho de juvenis de *Palaemon varians* expostos a diferentes cenários tróficos pré e pós-metamorfose

#### 3.2.1 – Introdução e objetivos

*Palaemon varians* é um crustáceo decápode com uma ampla distribuição geográfica habitando preferencialmente águas salobras e estuários (Antheunisse et al., 1971; Holthuis, 1978; Yúfera e Rodríguez, 1985; Bouchon, 1991; Dolmen et al., 2004; Hampel et al., 2004; González-Ortegón e Cuesta, 2006). Por apresentar um ciclo de vida curto (Jorge Palma et al., 2008) tem sido utilizado como organismo modelo em vários bioensaios (Cottin et al., 2012; Morris et al., 2015; Pavlaki et al., 2016) face ao interesse crescente em entender como é que os invertebrados marinhos lidam com alterações bióticas e abióticas potencialmente adversas. Deste modo, as respostas de *P. varians* as alterações promovidas por mudanças climáticas têm sido amplamente estudadas, tendo os trabalhos já realizados focado principalmente nos mecanismos de adaptação da espécie a cenários de aquecimento global (Cottin et al., 2010; González-Ortegón et al., 2013; New et al., 2014; Morris et al., 2015). Contudo, as mudanças climáticas em decorrência da ação antrópica podem ocasionar alterações nas interações tróficas das espécies (Bulletin et al., 2017; Wang et al., 2017). Estas alterações poderão desencadear períodos onde há escassez de recursos alimentares e consequentemente, condições tróficas desfavoráveis que podem ter diferentes impactos sob os organismos marinhos em geral e os crustáceos decápodes em particular (Calado et al., 2010b).

Os crustáceos decápodes são incapazes de sintetizar *de novo* ácidos graxos (AG) poli-insaturados (PUFA) e altamente insaturados (HUFA), pelo menos em quantidades que lhes permitam suprir as suas necessidades nutricionais (Kanazawa et al., 1979; Tacon, 1987; Rainuzzo et al., 1995; Cook e McMaster, 2002). Deste modo, estes AG são considerados essenciais estando diretamente envolvidos à manutenção das funções vitais destes organismos (Sorgeloos e Léger, 1992; Bell e Sargent, 2003; Das et al., 2007; Glencross, 2009; D'Abramo e New, 2010; Olivotto et al., 2017). Os AG essenciais são assim obtidos diretamente através da alimentação por parte destes organismos (Rainuzzo et al., 1995; González-Félix et al., 2002; Nelson e Cox, 2014). No entanto, perante um cenário de escassez de alimento e/ou baixa qualidade nutricional do mesmo, as espécies podem ficar vulneráveis a estresses nutricionais que poderão causar danos eventualmente irreparáveis. A capacidade de

recuperação ao estresse nutricional é uma adaptação importante para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento nos crustáceos decápodes (Zhang et al., 2014). Contudo, o estresse nutricional principalmente durante a fase larval pode influenciar seu desempenho pós-metamorfose (Pechenik et al., 1998; Pechenik, 2006). Apenas recentemente as pesquisas tem considerado os impactos que as condições impostas às larvas podem ocasionar na fase pós metamórfica (Pechenik, 2006; Calado et al., 2010b; Giménez, 2010; Souza et al., 2017) considerando assim, que a mortamorfose não apaga a história larval. Tendo em vista a importancia de avaliar as consequências do estresse trófico pré- e pós- metamorfose o presente trabalho testou a seguinte hipótese nula: o fornecimento de alimentação exógena imediatamente após a eclosão ou apenas no estágio larval de zoea II, assim como a utilização de uma presa viva (metanúplios de *Artemia*) com um perfil enriquecido em ácidos graxos não afetam o desempenho larval nem o perfil de ácidos graxos de juvenis de *Palaemon varians*.

### 3.2.2 – Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo de Crustáceos Decápodes da Universidade de Aveiro, Portugal e seguiu as etapas descritas abaixo.

#### 3.2.2.1 - Coleta e manutenção de reprodutores de *Palaemon varians*

O procedimento metodológico para coleta e manutenção de reprodutores de *Palaemon varians* utilizado neste trabalho foi idêntico ao descrito no item 3.1.2.1.

#### 3.2.2.2 - Delineamento experimental e condições de cultivo

Após a eclosão larvas de *P. varians* foram transferidas para o sistema de larvicultura com recirculação descrito por Calado et al. (2008) (Figura 30). A larvicultura foi realizada em dois grupos distintos relativamente ao início da alimentação exógena: alimentação em ZI imediatamente após a eclosão larval e alimentação apenas iniciada quando as larvas atingiram o estadio larval de ZII, nas seguintes condições de cultivo: salinidade 35, temperatura 28° C e fotoperíodo 12:12 (claro: escuro). As larvas foram alimentadas diariamente com náuplios de *Artemia* recém eclodidos (3 náuplios/mL) até a metamorfose.



Figura 30 - Sistema de recirculação para larvicultura de crustáceos decápodos descrito por Calado et al. (2008).

Após a metamorfose, 20 decapoditos de cada grupo foram selecionados para biometria e monitorização do perfil de ácidos graxos (AG) iniciais e 80 decapoditos de cada grupo foram transferidos para os cultivos individuais. O cultivo individual foi realizado em placas de polietileno com poços de 150 mL (Figura 31) nas seguintes condições: salinidade 35, temperatura 26 °C e fotoperíodo 12:12 (claro: escuro).



Figura 31 - Cultivo individual de juvenis de *Palaemon varians* em laboratório.

A partir da primeira ecdise realizada no cultivo os crustáceos foram considerados juvenis. Os decapoditos foram submetidos a quatro regimes tróficos diferentes conforme a qualidade do alimento fornecido. A utilização de metanúplios de *Artemia* enriquecidos ou não, foi realizada para simular os possíveis efeitos da qualidade da alimentação nos juvenis de *P. varians* em cenários adversos. O enriquecimento dos metanúplios foi feito por meio de uma emulsão rica em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA). Os quatro regimes tróficos utilizados durante o cultivo experimental foram: ME - metanúplio de *Artemia* enriquecido; ME → Met - metanúplio de *Artemia* enriquecido e metanúplio de *Artemia*; Met → ME - metanúplio de *Artemia* e metanúplio de *Artemia* enriquecido; Met - metanúplio de *Artemia*. Nas condições: ME → Met e Met → ME, foi realizada a troca de dieta fornecida aos juvenis, ou seja, inicialmente forneceu-se ME e a partir da terceira ecdise forneceu-se Met e vice-versa. O manejo dos crustáceos foi realizado diariamente. Os náuplios de *Artemia* foram obtidos a partir de cistos eclodidos sob densidade de 0,3 g/L em água com salinidade 25. 12 horas após a eclosão metade dos metanúplios recém metamorfoseados foram retirados e colocados em emulsão enriquecedora rica em HUFA, S.presso (Selco®), diluída em água com salinidade 25. Após 24 horas de eclosão e 12 horas de enriquecimento os metanúplios e metanúplios enriquecidos foram ofertados aos animais conforme seu respectivo tratamento na proporção de 3 metanúplios/mL. As trocas de água bem como a observação da ocorrência de ecdise e sobrevivência foram realizadas diariamente. Após a quinta ecdise, foi determinada a biometria final dos organismos e o experimento foi concluído.

A biometria inicial e final dos camarões foi realizada por meio da mensuração do comprimento da carapaça (CC: comprimento da margem pós - orbital à margem médio - posterior dorsal do cefalotórax) (estereomicroscópio Stemi 2000 - C Zeiss) para obtenção do comprimento total (CT: distância entre a extremidade anterior do rostro à extremidade posterior do telso) por meio da equação:  $CT = 1,2561CC + 4,1478$  (Figura 26). Posteriormente os juvenis foram liofilizados para obtenção do seu peso seco (balança analítica com precisão 0,0001 g Kern). A partir dos dados biométricos foram obtidos os seguintes parâmetros de crescimento: percentagem de ganho de peso (GP %,  $(\text{massa corporal final} - \text{massa corporal inicial}) / \text{massa corporal inicial} * 100$ ) e taxa de crescimento específico (TCE  $\% \cdot \text{dia}^{-1}$ ,  $\log n \text{ massa corporal final} - \log n \text{ massa corporal inicial} / (\text{dias}) * 100$ ).

### 3.2.2.3 - Análise de ácidos graxos

A amostragem para obtenção do perfil de ácidos graxos dos juvenis obtidos ao final do cultivo, foi feita por meio de uma amostra composta com exemplares de juvenis de cada tratamento nomeadamente, início de alimentação exógena (ZI e ZII) e regime trófico (ME, ME → Met, Met → ME, Met), com 3 réplicas cada. O procedimento metodológico para análise de ácidos graxos utilizado neste trabalho foi idêntico ao descrito no item 3.2.2.3. Neste trabalho, os SFA foram definidos pela ausência de instauração, os MUFA presença de 1 insaturação, os PUFA pela presença de  $\geq 2$  dupla ligação e os HUFA pela presença de  $\geq 4$  dupla ligação.

### 3.2.2.4 - Análise de dados

Em relação aos dados obtidos no cultivo experimental, foram avaliados: a duração do cultivo até à quinta ecdise pós-metamorfose (dias), comprimento total (mm), peso (mg), ganho de peso (%) e taxa de crescimento específico (%.dia<sup>-1</sup>) dos juvenis 5. A matriz de similaridade entre as amostras foi obtida por meio da distância euclidiana, seguindo a transformação de  $\log x + 1$ . Os dados obtidos foram comparados por meio de uma PERMANOVA (análise multivariada permutativa de variância) de duas vias considerando  $p < 0,05$ . Foram considerados dois fatores independentes: o início da alimentação exógena e o regime trófico pós-metamorfose, com 2 e 4 níveis respectivamente. O fator regime trófico foi aninhado ao fator início da alimentação exógena. Quando foram detectadas diferenças significativas os diferentes tratamentos foram comparados utilizando um teste do tipo *Pair-wise* e um nível de significância  $p < 0,05$ .

Para os dados de ácidos graxos (AG), a matriz de similaridade entre as amostras foi obtida por meio do coeficiente de similaridade de Bray – Curtis, seguindo a transformação de  $\log x + 1$ . Os dados obtidos foram comparados igualmente por meio de uma PERMANOVA de duas vias considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ . Da mesma foram considerados os dois fatores de cultivo tal como descrito acima, assim como a utilização de teste tipo *Pair-wise* ( $p < 0,05$ ) para aferir a existência de diferenças significativas entre tratamentos. As diferenças nos perfis de AG com mais de 50% de representatividade entre o início da alimentação exógena em ZI e ZII e os juvenis obtidos ao final do cultivo em diferentes

regimes tróficos foram exploradas por meio da rotina de percentuais de similaridade (SIMPER).

A análise de dados foi realizada com o software Primer 6 com o complemento PERMANOVA (Primer – E Ltd., Plymouth, Reino Unido).

### 3.2.3 - Resultados

Não foram observadas diferenças significativas entre o CT, PS, TCE e GP e o início da alimentação exógena ( $p > 0,05$ ). No entanto, os camarões expostos a diferentes regimes tróficos apresentaram diferenças significativas no CT, PS, TCE e GP ( $p < 0,05$ ). Os juvenis alimentados com ME apresentaram maiores valores médios de CT:  $6,70 \pm 0,11$  e  $6,63 \pm 0,13$  mm com início de alimentação exógena em ZI e ZII respectivamente. A mesma tendência foi observada para o PS, com  $2,53 \pm 0,22$  g e  $2,44 \pm 0,36$  g, TCE com  $2,29 \pm 0,44$  (%dia<sup>-1</sup>) e  $1,93 \pm 0,25$  (%dia<sup>-1</sup>) e GP com  $434,00 \pm 108,00$  % e  $370,00 \pm 86,00$  %. O regime trófico Met apresentou os valores médios mais baixos no que diz respeito ao desempenho dos juvenis, tanto no início da alimentação exógena em ZI quanto em ZII (Tabela 12).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre a duração do cultivo experimental e o início da alimentação exógena das larvas (ZI e ZII) ( $p > 0,05$ ). Os diferentes regimes tróficos apresentaram diferenças significativas entre a duração do cultivo experimental ( $p < 0,05$ ). O regime trófico ME apresentou menor tempo de cultivo que os demais tratamentos, nas duas condições de alimentação exógena (iniciada em ZI imediatamente após a eclosão ou apenas iniciada em ZII), com uma média de 18 dias de cultivo. A duração máxima do cultivo foi de 24 dias nos juvenis que receberam a dieta Met (Figura 32).

Tabela 12 - Desempenho de juvenis de *Palaemon varians* submetidos à diferentes regimes tróficos.

| Início da alimentação exógena em ZI            |                            |                            |                             |                           |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|  | ME                         | ME→Met                     | Met→ME                      | Met                       |
| CT (mm) max                                    | 7,02                       | 7,10                       | 6,73                        | 6,80                      |
| CT (mm) média±desvio padrão                    | 6,70±0,11 <sup>a</sup>     | 6,66±0,29 <sup>a</sup>     | 6,48±0,24 <sup>b</sup>      | 6,46±0,31 <sup>b</sup>    |
| CT (mm) min                                    | 6,51                       | 6,36                       | 6,62                        | 6,21                      |
| PS (mg) max                                    | 2,84                       | 2,71                       | 4,00                        | 2,90                      |
| PS (mg) média±desvio padrão                    | 2,53±0,22 <sup>a</sup>     | 2,40±0,25 <sup>b</sup>     | 2,21±0,62 <sup>c</sup>      | 2,21±0,52 <sup>c</sup>    |
| PS (mg) min                                    | 2,10                       | 1,98                       | 0,71                        | 1,74                      |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) max                 | 3,57                       | 2,70                       | 2,14                        | 1,83                      |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) média±desvio padrão | 2,29±0,44 <sup>a</sup>     | 1,96±0,28 <sup>ab</sup>    | 1,90±0,40 <sup>b</sup>      | 1,64±0,28 <sup>c</sup>    |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) min                 | 1,71                       | 1,47                       | 1,23                        | 1,22                      |
| GP (%) max                                     | 735,00                     | 576,00                     | 669,00                      | 472,00                    |
| GP (%) média±desvio padrão                     | 434,00±108,00 <sup>a</sup> | 399,00±85,00 <sup>ab</sup> | 366,00±149,00 <sup>ab</sup> | 341,00±116 <sup>b</sup>   |
| GP (%) min                                     | 262,00                     | 421,00                     | 258,00                      | 250,00                    |
| Início da alimentação exógena em ZII           |                            |                            |                             |                           |
|  | ME                         | ME→Met                     | Met→ME                      | Met                       |
| CT (mm) max                                    | 6,95                       | 6,73                       | 6,88                        | 7,18                      |
| CT (mm) média±desvio padrão                    | 6,63±0,13 <sup>a</sup>     | 6,58±0,17 <sup>a</sup>     | 6,38±0,25 <sup>b</sup>      | 6,54±0,18 <sup>b</sup>    |
| CT (mm) min                                    | 6,43                       | 6,21                       | 6,00                        | 5,85                      |
| PS (mg) max                                    | 2,88                       | 3,03                       | 3,33                        | 3,43                      |
| PS (mg) média±desvio padrão                    | 2,44±0,36 <sup>a</sup>     | 2,38±0,35 <sup>b</sup>     | 2,08±0,72 <sup>b</sup>      | 2,38±0,36 <sup>b</sup>    |
| PS (mg) min                                    | 1,52                       | 1,67                       | 1,12                        | 1,35                      |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) max                 | 2,34                       | 2,37                       | 2,74                        | 2,27                      |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) média±desvio padrão | 1,93±0,25 <sup>a</sup>     | 1,83±0,29 <sup>b</sup>     | 1,73±0,23 <sup>b</sup>      | 1,58±0,18 <sup>c</sup>    |
| TCE (% dia <sup>-1</sup> ) min                 | 1,38                       | 1,32                       | 1,12                        | 1,19                      |
| GP (%) max                                     | 500,00                     | 569,00                     | 626,00                      | 525,00                    |
| GP (%) média±desvio padrão                     | 370,00±86,00 <sup>a</sup>  | 363,00±95,00 <sup>b</sup>  | 301,00±136,55 <sup>b</sup>  | 355,00±66,33 <sup>b</sup> |
| GP (%) min                                     | 176,00                     | 229,00                     | 93,00                       | 174,00                    |

CT: comprimento total; PS: peso seco; GP: ganho de peso; TCE: taxa de crescimento específico.

ME: metanáuplio de *Artemia* enriquecido; ME → Met: metanáuplio de *Artemia* enriquecido e metanáuplio de *Artemia*; Met → ME: metanáuplio de *Artemia* e metanáuplio de *Artemia* enriquecido; Met: metanáuplio de *Artemia*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes regimes tróficos ( $p<0,05$ ).



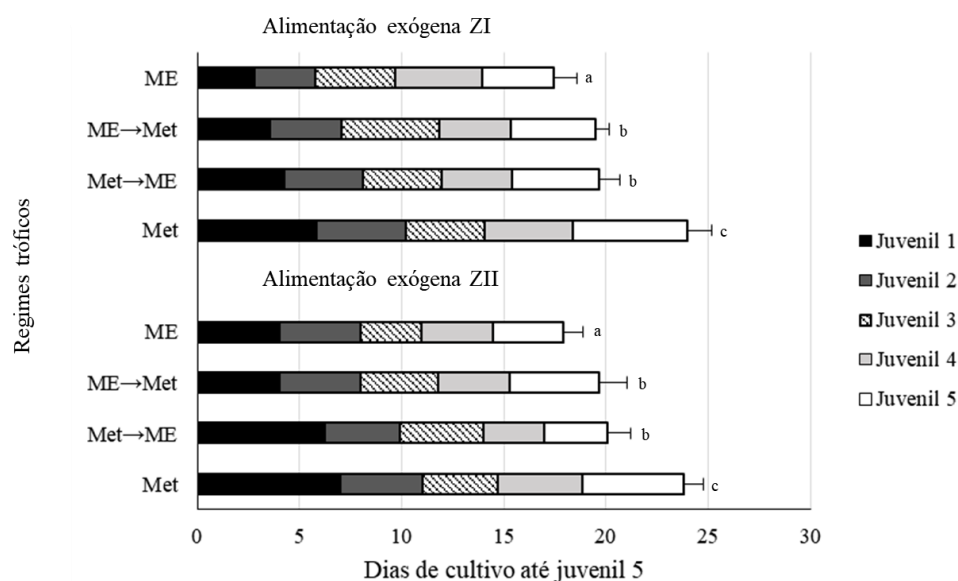


Figura 32 - Cultivo (dias) de *Palaemon varians* em diferentes regimes tróficos. ME: metanáuplio de *Artemia* enriquecido; ME → Met: metanáuplio de *Artemia* enriquecido e metanáuplio de *Artemia*; Met → ME: metanáuplio de *Artemia* e metanáuplio de *Artemia* enriquecido; Met: metanáuplio de *Artemia*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes níveis tróficos ( $p < 0,05$ ).

A tabela 13 apresenta o perfil de ácidos graxos (AG) inicial de decapóditos de *P. varians*. Observa-se que a maior concentração de AG foi obtida nos animais que receberam alimentação exógena em ZII ( $p < 0,05$ ). Os AG com  $> 50\%$  de representatividade nas diferenças significativas encontradas entre o perfil de AG de decapóditos com início de alimentação exógena em ZI e o perfil de AG dos juvenis ao final de cultivo são: ME – 20:5n-3, 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 22:6n-3 e 18:2n-6; ME → Met – 18:3n-3, 18:1n-9, 18:1n-6 e 18:0; Met → ME: 20:5n-3, 18:1n-9, 18:2n-6, 16:0 e 22:6n-3; Met – 18:3n-3, 18:1n-9, 18:2n-6 e 18:0. Do mesmo modo, os AG com  $> 50\%$  de representatividade nas diferenças significativas encontradas entre o perfil de AG de decapóditos com início de alimentação exógena em ZII e o perfil de AG dos juvenis ao final de cultivo são: ME – 18:3n-3, 22:6n-3, 20:3n-3 e 18:1n-9; ME → Met – 18:3n-3, 18:0, 22:6n-3 e 16:1n-7; Met → ME: 18:3n-3, 18:1n-9, 18:0 e 18:1n-7; Met – 18:3n-3, 18:2n-6, 18:1n-9, 20:5n-3 e 18:0 (Tabela 14).

Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos de decapoditos recém metamorfoseados de *Palaemon varians* obtidos em larvicultura com início da alimentação exógena em ZI ou ZII. Valores expressos em µg/mg de peso seco.

| AG      | Alimentação exógena ZI <sup>a</sup> | Alimentação exógena ZII <sup>b</sup> |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 14:0    | 1,20±0,03                           | 1,30±0,03                            |
| 15:0    | 0,57±0,01                           | 0,59±0,01                            |
| 16:0    | 7,07±0,01                           | 9,08±0,01                            |
| 17:0    | 0,84±0,01                           | 0,96±0,01                            |
| 18:0    | 5,20±0,38                           | 6,28±0,05                            |
| 20:0    | 1,10±0,07                           | 1,14±0,07                            |
| 22:0    | 1,26±0,10                           | 1,25±0,09                            |
| Σ SFA   | 17,23±0,5                           | 20,59±0,06                           |
| 16:1n-9 | 0,75±0,03                           | 0,83±0,03                            |
| 16:1n-7 | 0,90±0,08                           | 1,02±0,02                            |
| 17:1n-9 | 0,68±0,01                           | 0,72±0,03                            |
| 18:1n-9 | 8,13±0,08                           | 10,35±0,05                           |
| 18:1n-7 | 4,86±0,11                           | 5,98±0,39                            |
| 20:1n-9 | 0,71±0,01                           | 0,80±0,07                            |
| Σ MUFA  | 16,11±0,07                          | 19,69±0,04                           |
| 18:2n-6 | 2,49±0,03                           | 3,16±0,09                            |
| 18:3n-3 | 8,26±0,20                           | 11,19±0,03                           |
| 20:2n-6 | 0,71±0,01                           | 0,78±0,02                            |
| 20:3n-3 | 0,84±0,05                           | 1,01±0,06                            |
| 22:2n-6 | 0,91±0,01                           | 0,85±0,03                            |
| Σ PUFA  | 13,21±0,11                          | 16,98±0,53                           |
| 20:4n-6 | 1,67±0,19                           | 2,04±0,18                            |
| 20:5n-3 | 5,15±0,97                           | 6,39±1,02                            |
| 22:6n-3 | 4,25±0,15                           | 4,16±0,21                            |
| Σ HUFA  | 11,07±1,30                          | 12,59±1,39                           |
| TOTAL   | 57,55±1,77                          | 69,85±0,68                           |

AG: ácidos graxos; SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre o início da alimentação exógena em diferentes estágios larvais ( $p<0,05$ ).

Tabela 14 - Análise de percentual de similaridade (SIMPER). Identificação dos ácidos graxos (AG) que contribuem para as diferenças no perfil de ácidos graxos entre os decapoditos de *Palaemon varians* provenientes de larvicultura com início da alimentação exógena em ZI e ZII e juvenis obtidos ao final do cultivo em diferentes níveis tróficos.

| ZI vs. ME  |         |      | ZI vs. ME→Met  |         |      | ZI vs. Met→ME  |         |      | ZI vs. Met  |         |      |
|------------|---------|------|----------------|---------|------|----------------|---------|------|-------------|---------|------|
| AG         | Contr.% | Cum% | AG             | Contr.% | Cum% | AG             | Contr.% | Cum% | AG          | Contr.% | Cum% |
| 20:5n-3    | 11,3    | 11,3 | 18:3n-3        | 22,1    | 22,1 | 20:5n-3        | 12,4    | 12,4 | 18:3n-3     | 19,0    | 19,0 |
| 16:0       | 10,3    | 21,7 | 18:1n-9        | 10,9    | 33,0 | 18:1n-9        | 10,4    | 22,8 | 18:1n-9     | 12,4    | 31,4 |
| 18:1n-9    | 10,3    | 32,0 | 18:2n-6        | 10,8    | 43,8 | 18:2n-6        | 10,0    | 32,7 | 18:2n-6     | 11,8    | 43,3 |
| 18:1n-7    | 8,9     | 50,0 | 18:0           | 9,6     | 53,4 | 16:0           | 9,8     | 42,6 | 18:0        | 9,4     | 52,8 |
| 22:6n-3    | 8,7     | 49,6 |                |         |      | 22:6n-3        | 9,1     | 51,7 |             |         |      |
| 18:2n-6    | 8,3     | 57,8 |                |         |      |                |         |      |             |         |      |
| ZII vs. ME |         |      | ZII vs. ME→Met |         |      | ZII vs. Met→ME |         |      | ZII vs. Met |         |      |
| AG         | Contr.% | Cum% | AG             | Contr.% | Cum% | AG             | Contr.% | Cum% | AG          | Contr.% | Cum% |
| 18:3n-3    | 31,4    | 31,4 | 18:3n-3        | 25,1    | 25,1 | 18:3n-3        | 26,1    | 26,1 | 18:3n-3     | 16,7    | 16,7 |
| 22:6n-3    | 9,0     | 40,4 | 18:0           | 9,5     | 34,6 | 18:1n-9        | 9,4     | 35,6 | 18:2n-6     | 12,0    | 28,7 |
| 20:3n-3    | 7,0     | 47,5 | 22:6n-3        | 9,2     | 43,8 | 18:0           | 7,7     | 43,3 | 18:1n-9     | 10,5    | 39,2 |
| 18:1n-9    | 6,9     | 54,5 | 16:1n-7        | 9,0     | 52,9 | 18:1n-7        | 7,7     | 51,0 | 20:5n-3     | 9,8     | 49,1 |
|            |         |      |                |         |      |                |         |      | 18:0        | 9,5     | 58,7 |

ME: metanáuplio de *Artemia* enriquecido; ME → Met: metanáuplio de *Artemia* enriquecido e metanáuplio de *Artemia*; Met → ME: metanáuplio de *Artemia* e metanáuplio de *Artemia* enriquecido; Met: metanáuplio de *Artemia*. Crontr. = contribuição da variável ácido graxo; Cum. = contribuição cumulativa.

Não foram observadas diferenças significativas no perfil de AG dos juvenis com início de alimentação exógena ZI e ZII ( $p > 0,05$ ). O perfil de AG dos juvenis alimentados com os diferentes regimes tróficos apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Os juvenis que foram alimentados com a dieta ME apresentaram um perfil de AG com concentrações superiores aos demais conspecíficos expostos a regimes tróficos em ambas condições de início de alimentação exógena (ZI ou ZII). Os juvenis de *P. varians* que receberam a dieta Met apresentaram menores concentrações de AG, tanto com início de alimentação em ZI como em ZII (Tabela 15).

Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos (AG) de juvenis de *Palaemon varians*, valores expressos em µg AG/mg de peso seco (média±desvio padrão).

| AG      | Alimentação exógena ZI |                        |                       |                  | Alimentação exógena ZII |                       |                        |                  |
|---------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
|         | ME <sup>a</sup>        | ME → Met <sup>bc</sup> | Met → ME <sup>a</sup> | Met <sup>c</sup> | ME <sup>a</sup>         | ME → Met <sup>b</sup> | Met → ME <sup>ac</sup> | Met <sup>c</sup> |
| 14:0    | 2,03±0,15              | 1,13±0,01              | 1,87±0,35             | 1,20±0,06        | 1,30±0,08               | 1,38±0,04             | 1,27±0,15              | 1,30±0,16        |
| 15:0    | 0,71±0,03              | 0,54±0,01              | 0,67±0,04             | 0,54±0,01        | 0,58±0,02               | 0,63±0,01             | 0,59±0,03              | 0,62±0,05        |
| 16:0    | 15,97±1,72             | 5,42±0,43              | 13,61±2,01            | 6,86±2,61        | 8,12±0,42               | 9,02±1,09             | 6,72±2,14              | 8,48±2,97        |
| 17:0    | 1,22±0,07              | 0,70±0,04              | 1,00±0,08             | 0,67±0,05        | 0,81±0,01               | 0,92±0,04             | 0,74±0,13              | 0,91±0,28        |
| 18:0    | 8,67±0,69              | 3,49±0,44              | 7,28±0,85             | 4,30±1,50        | 4,85±0,41               | 5,23±0,32             | 4,21±0,86              | 5,44±1,98        |
| 20:0    | 1,52±0,07              | 1,05±0,09              | 1,25±0,03             | 1,08±0,04        | 1,23±0,12               | 1,13±0,04             | 1,15±0,06              | 1,11±0,08        |
| 22:0    | 1,96±0,10              | 1,23±0,15              | 1,52±0,14             | 1,23±0,10        | 1,42±0,17               | 1,26±0,05             | 1,33±0,10              | 1,33±0,23        |
| Σ SFA   | 32,06±2,49             | 13,55±1,16             | 27,20±15,87           | 15,87±4,11       | 18,32±1,09              | 18,52±0,34            | 16,00±3,47             | 15,97±0,92       |
| 16:1n-9 | 1,02±0,02              | 0,68±0,01              | 1,03±0,11             | 0,66±0,01        | 0,78±0,01               | 0,84±0,01             | 0,67±0,036             | 0,75±0,07        |
| 16:1n-7 | 1,79±0,11              | 0,85±0,03              | 1,85±0,36             | 0,85±0,07        | 1,03±0,08               | 1,28±0,19             | 0,92±0,12              | 0,97±0,08        |
| 17:1n-9 | 0,79±0,04              | 0,62±0,02              | 0,82±0,04             | 0,66±0,01        | 0,68±0,03               | 0,70±0,01             | 0,63±0,04              | 0,71±0,06        |
| 18:1n-9 | 18,01±0,70             | 5,32±0,53              | 16,16±3,07            | 5,45±0,20        | 8,03±0,75               | 9,49±0,42             | 6,55±1,46              | 7,65±1,29        |
| 18:1n-7 | 10,04±0,01             | 3,68±0,29              | 8,40±1,49             | 3,84±0,07        | 4,61±0,21               | 6,01±0,28             | 3,98±0,64              | 4,49±0,58        |
| 20:1n-9 | 1,15±0,07              | 0,80±0,13              | 1,01±0,08             | 0,65±0,01        | 0,72±0,03               | 0,74±0,02             | 0,69±0,02              | 0,79±0,01        |
| Σ MUFA  | 32,80±0,60             | 11,94±0,75             | 29,26±5,15            | 12,10±0,14       | 15,85±0,89              | 19,74±0,22            | 13,45±2,34             | 14,57±1,37       |
| 18:2n-6 | 5,29±0,18              | 1,42±0,13              | 5,34±0,84             | 1,50±0,05        | 2,34±0,25               | 2,59±0,03             | 2,13±0,36              | 1,60±0,36        |
| 18:3n-3 | 9,84±0,26              | 3,39±0,35              | 9,99±3,26             | 4,45±0,21        | 3,34±0,57               | 6,74±0,57             | 2,83±0,66              | 5,13±1,56        |
| 20:2n-6 | 0,95±0,01              | 0,67±0,01              | 0,88±0,07             | 0,72±0,02        | 0,75±0,02               | 0,76±0,02             | 0,73±0,01              | 0,73±0,03        |
| 20:3n-3 | 1,05±0,02              | 0,48±0,03              | 1,01±0,25             | 0,56±0,08        | 0,59±0,05               | 0,70±0,01             | 0,51±0,01              | 0,68±0,16        |
| 22:2n-6 | 0,86±0,02              | 0,84±0,05              | 0,82±0,04             | 0,95±0,07        | 0,89±0,07               | 0,86±0,01             | 1,00±0,06              | 0,78±0,06        |
| Σ PUFA  | 17,98±0,08             | 6,80±0,57              | 18,04±4,44            | 8,17±0,32        | 7,90±0,50               | 11,23±0,13            | 7,119±0,97             | 10,04±0,46       |
| 20:4n-6 | 2,46±0,03              | 1,35±0,24              | 2,36±0,25             | 1,46±0,10        | 1,53±0,11               | 1,78±0,12             | 1,33±0,30              | 1,49±0,07        |
| 20:5n-3 | 12,61±0,25             | 4,07±0,73              | 11,78±1,50            | 4,13±0,44        | 6,93±0,45               | 6,53±0,74             | 5,58±1,11              | 3,68±1,08        |
| 22:6n-3 | 8,74±0,35              | 4,65±0,10              | 8,06±0,67             | 4,16±0,07        | 5,96±0,24               | 5,40±0,24             | 5,53±0,56              | 4,78±1,29        |
| Σ HUFA  | 23,82±0,06             | 10,06                  | 22,20±2,41            | 9,74±0,53        | 14,42±0,71              | 12,88±0,27            | 12,44±1,96             | 9,85±0,07        |
| TOTAL   | 106,68±3,25            | 42,37±3,56             | 96,72±4,89            | 45,90±4,21       | 56,52±0,94              | 64,00±2,13            | 49,09±8,75             | 53,4±5,79        |

ME: metanáuplio de *Artemia* enriquecido; ME → Met: metanáuplio de *Artemia* enriquecido e metanáuplio de *Artemia*; Met → ME: metanáuplio de *Artemia* e metanáuplio de *Artemia* enriquecido; Met: metanáuplio de *Artemia*; SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; HUFA: ácidos graxos altamente insaturados. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes níveis tróficos ( $p<0,05$ ).

### 3.2.4 – Discussão

O presente trabalho fornece informações sobre o desempenho de juvenis de *Palaemon varians* quando expostos a diferentes regimes tróficos pré- e pós-metamorfose que simulam diferenças quantitativas e qualitativas no alimento disponível. Os resultados obtidos sugerem que o período de inanição durante fase larval e a posterior alimentação não interfere no desempenho dos juvenis em relação ao crescimento somático e de biomassa. Este fato pode

estar associado à capacidade de *P. varians* mobilizar suas reservas energéticas durante a ausência de alimento, dada sua elevada tolerância à inanição durante a fase larval (Oliphant e Thatje, 2014). Embora não seja uma condição limitante ao seu desenvolvimento, no sentido em que não promove mortalidade, o desempenho de juvenis de *P. varians* é sempre inferior quando a alimentação exógena é iniciada em ZII (Tabela 12, Figura 32).

Os resultados obtidos demonstram que a alimentação com um perfil de ácidos graxos (AG) melhorado (ME), tem efeitos positivos no crescimento e peso dos juvenis, esta tendência é mantida quando os juvenis de camarão passam a receber alimentos de qualidade inferior (ME→Met). Este tipo de resposta foi igualmente observada em crustáceos decápodes que apresentaram crescimento compensatório em condições de cultivo onde houve privação de alimento (Wu et al., 2001; Stumpf et al., 2010). Perante um cenário trófico inverso, em que os juvenis de camarões passam a receber alimentos de qualidade superior (Met→ME e Met) não são capazes de compensar a baixa qualidade do alimento que lhes é fornecido, apresentando um desempenho inferior aos restantes conspecíficos. Esta tendência sugere assim que em cenários onde exista uma carência de presas e/ou presas de baixa qualidade nutricional, as reservas energéticas dos juvenis serão primeiramente mobilizadas para a sobrevivência e não para o crescimento somático e acúmulo de biomassa (Stumpf et al., 2010; Zhang et al., 2014).

O perfil de AG dos decapoditos obtidos ao final da larvicultura (Tabela 13) demonstram um aumento nas concentrações de AG nos animais com início de alimentação exógena em ZII. Este fato sugere que em resposta a falta inicial de alimento imediatamente após a eclosão e durante todo o estado de ZI, existe uma maior mobilização dos AG adquiridos aquando da oferta de alimentação exógena para reservas energéticas que poderão ser catabolizadas futuramente se necessário. Quando comparados ao perfil de AG dos juvenis obtidos ao final de cultivo, os AG com maior representatividade nas diferenças encontradas nas duas condições de alimentação exógena (Tabela 14), são essencialmente os PUFA e HUFA, nomeadamente nos cenários onde o alimento disponível é de baixa qualidade. Este resultado confirma que estes AG podem ser preservados por meio de uma retenção seletiva por parte dos organismos expostos a um período considerado troficamente desfavorável (Glencross, 2009).

Nas duas condições de início de alimentação exógena (ZI ou ZII), a mudança de cenário trófico teve influência na composição de AG dos juvenis de *P. varians* (Tabela 15). Os resultados obtidos sugerem que a redução dos SFA e MUFA nos cenários onde houve uma redução da qualidade do alimento fornecido possa estar relacionada à catabolização destes

para obtenção de energia e satisfação das necessidades basais inerentes à sobrevivência (Nates e McKenney, 2000; Yao et al., 2006).

Os juvenis alimentados com as dietas de melhor qualidade (ME) apresentaram maiores concentrações de PUFA e HUFA. Estes AG são essenciais nos crustáceos decápodes, sendo obtidos por meio da alimentação e estão diretamente envolvidos na manutenção de funções vitais nos organismos (Sorgeloos e Léger, 1992; Bell e Sargent, 2003; Das et al., 2007; Glencross, 2009; D'Abramo e New, 2010; Olivotto et al., 2017). Desta forma, seria expectável que, caso o experimento fosse prolongado para além da quinta ecdise pós-metamorfose, estes organismos apresentassem um melhor desempenho. Será relevante salientar que o aumento nas concentrações de PUFA e HUFA, no cenário Met→ME (Tabela 15), sugere um aumento na ingestão do alimento fornecido, de modo a suprir as suas necessidades nutricionais. Esta premissa é confirmada pelo fato de muitos destes AG estarem relacionados com um regime alimentar que assenta na carnivoria, tal como aquele que foi proporcionado aos organismos em cultivo no regime trófico em questão (Kelly e Scheibling, 2012).

Relativamente aos juvenis de *P. varians* expostos a um regime trófico Met, caracterizado pela baixa qualidade nutricional do alimento, as concentrações de AG que estes apresentaram são significativamente inferiores às aquelas exibidas pelos conspécificos expostos aos restantes regimes tróficos testados no presente estudo (Tabela 15), nomeadamente quando a alimentação exógena é iniciada em ZII. Estes resultados sugerem uma grande mobilização de AG para a manutenção das funções vitais nestes crustáceos. Embora não sejam limitantes à vida de *P. varians*, os cenários de alimentação desfavorável poderão comprometer algumas fases do ciclo de vida da espécie, pois o perfil de AG disponível para um organismo condiciona fortemente a sua sobrevivência e sucesso reprodutor (Racotta et al., 2003; Olivotto et al., 2011; Calado, 2017).

Nos ambientes aquáticos a principal fonte de AG essenciais são os produtores primários e estes são transferidos consecutivamente ao longo da cadeia alimentar. Perante os atuais cenários inerentes às mudanças climáticas é evidente que estas podem promover impactos dramáticos nas interações tróficas no meio aquático, quer quantitativa quer qualitativamente (Bulletin et al., 2017; Wang et al., 2017). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho permitem aferir que mesmo para uma espécie com elevada plasticidade fenotípica, trófica e ambiental as possíveis consequências promovidas por uma exposição a cenários tróficos desfavoráveis pré- e pós-metamorfose pode ser negativa e muito significativa. No caso de organismos menos tolerantes a flutuações tróficas é expectável que, ao contrário das

consequências previstas para *P. varians*, estes organismos possam experimentar efeitos negativos mais dramáticos e irreversíveis que comprometam o seu desempenho pré- e pós-metamorfose. Efetivamente, tal como referido por Pechenik et al. (1998) “a metamorfose não apaga a história larval e não é um novo começo” evidenciando assim, as estreitas ligações entre a fase planctônica e bentônica no ciclo de vida dos crustáceos dacápodes e as severas consequências que o estresse nutricional ocasiona em sua história de vida.





## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

#### 4.1 – Considerações finais

Os resultados obtidos no presente estudo não permitem rejeitar a primeira hipótese nula proposta. Deste modo, o investimento maternal no perfil de ácidos graxos (AG) presentes em larvas recém-eclodidas não é influenciado pelo tamanho da fêmea. Perante estes resultados, a seleção de reprodutores de *Macrobrachium pantanalense* não deve ser baseada exclusivamente pelo tamanho apresentado por estes, embora seja reconhecido que fêmeas maiores produzem um maior número de larvas. Contudo, perante uma escassez de fêmeas grandes para constituir matrizes de reprodutores, o recurso somente a fêmeas pequenas não irá traduzir necessariamente numa menor qualidade larval que possa condicionar o sucesso da larvicultura e posterior crescimento de juvenis.

Embora *M. pantanalense* seja um crustáceo dulcícola, o cultivo desta espécie em laboratório só é possível em condições de salinidade. Deste modo, a segunda hipótese nula testada no presente trabalho foi rejeitada, uma vez que é necessária alguma salinidade para conseguir realizar o cultivo larval desta espécie *ex situ*. Efetivamente, um cultivo larval a uma salinidade de 4 garantiu uma maior sobrevivência durante a larvicultura, a realização da metamorfose em menor tempo e a produção de decapoditos com melhor condição (em termos de tamanho e peso). Os resultados do presente trabalho possibilitam assim a validação de um primeiro protocolo de cultivo laboratorial para *M. pantanalense* onde a utilização de uma salinidade de 4 para a larvicultura assume como fator fundamental para um cultivo de sucesso.

O presente trabalho permitiu demonstrar que a salinidade e a exposição a diferentes períodos de inanição após a eclosão interferem de forma significativa no desenvolvimento larval e no perfil de ácidos graxos de *Palaemon varians*. Embora esta espécie apresente características euralinas, conseguindo assim adaptar-se facilmente a diferentes salinidades (Dolmen et al., 2014, New et al, 2014), os resultados documentados demonstraram que a larvicultura de *P. varians* em laboratório apresenta um ótimo a uma salinidade de 35. Adicionalmente, embora *P. varians* apresente lecitotrofia primária facultativa na sua primeira fase larval (Oliphant e Thatje, 2014b), os resultados obtidos demonstraram claramente a relevância de dar início à alimentação exógena logo após a eclosão e não aquando da passagem das larvas para o estadio de ZII. Este estudo permite assim dar mais um contributo relevante para a produção em cativeiro de *P. varians*, clarificando de forma inequívoca as vantagens associadas à utilização de uma salinidade de 35 e as desvantagens produtivas de

economizar na utilização de presas vivas (entenda-se náuplios de *Artemia*) imediatamente após a eclosão larval, mesmo que este procedimento possa representar um encargo financeiro não negligenciável para a produção.

As respostas fenotípicas e fisiológicas de *P. varians* em relação às alterações globais têm sido amplamente estudadas, mas os aspectos inerentes à exposição a cenários tróficos desfavoráveis pré- e pós-metamorfose é ainda incipiente nesta e noutras espécies aquáticas. A quarta hipótese nula proposta no presente estudo é igualmente rejeitada, uma vez que o início da alimentação exógena e a utilização de um regime trófico mais favorável (metanáuplios de *Artemia* enriquecidos) afetam de forma determinante o desempenho e o perfil de ácidos graxos de juvenis de *P. varians*. Os juvenis que foram expostos a um período de inanição durante a fase inicial de cultivo larval apresentaram invariavelmente um desempenho inferior. Da mesma forma, a redução na qualidade do alimento fornecido teve como consequência um atraso no desenvolvimento dos juvenis, bem como uma condição inferior em termos de tamanho e peso dos juvenis produzidos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram assim de forma inequívoca as consequências fenotípicas e fisiológicas que podem decorrer da exposição a cenários tróficos desfavoráveis, mesmo quando se trate de uma espécie amplamente reconhecida por apresentar uma elevada plasticidade fenotípica, trófica e ambiental.

#### 4.2 – Perspectivas futuras

O desenvolvimento e a otimização de protocolos de cultivos de crustáceos decápodes *ex situ* realizado neste trabalho possibilita uma oportunidade para aperfeiçoar a aquicultura de organismos aquáticos utilizados em bioensaios. Tendo em vista o atual cenário de alterações climáticas globais, os ensaios laboratoriais utilizando espécies modelo são determinantes para proceder a exercícios fiáveis de previsão das consequências ocasionadas pelas alterações climáticas globais.

A utilização de *Macrobrachium pantanalense* como organismos modelo em estudos ecológicos no Pantanal Sul Matogrossense pode permitir a realização de forma sistemática e rigorosa de avaliações referentes aos potenciais impactos ambientais que as alterações globais poderão promover na região. O conhecimento da salinidade ideal para cultivo de *M. pantanalense*, permite realizar a sua larvicultura em laboratório com sucesso, embora existam ainda alguns gargalos para o desenvolvimento de técnicas de cultivo laboratorial desta

espécie. De entre esses fatores, merece destaque a densidade de estocagem das larvas durante a larvicultura, pois pode condicionar o sucesso no cultivo de organismos aquáticos e à data não existe ainda informação disponível para a estocagem ideal de *M. pantanalense*. Da mesma forma, ainda não existem informações sobre as taxas de ingestão de presas vivas (p. e. nauplios de *Artemia*) durante a fase larval de *M. pantanalense*, o que permitirá otimizar o manejo alimentar da espécie e possibilitar uma redução nos custos de produção durante a sua larvicultura. O conhecimento referente às exigências nutricionais de *M. pantanalense* em todas as fases de cultivo ainda são escassas, porém são fundamentais para a manutenção destes organismos em laboratório, possibilitando adequar os nutrientes das dietas de maturação, de produção larval e de crescimento de juvenis que são fornecidas a estes organismos. Pesquisas relacionadas ao investimento maternal durante a embriogênese podem fornecer informações sobre as mudanças bioquímicas que ocorrem nesta fase, permitindo assim o desenvolvimento de dietas de maturação adequadas a espécie.

A aplicabilidade de *P. varians* como espécie modelo em bioensaios possibilita a realização de estudos em diversas áreas da biologia. Devido às suas características euralinas e eutermicas, o emprego de *P. varians* em bioensaios abordando a temática das alterações climáticas globais possibilita compreender de um modo mais aprofundado as respostas metabólicas e fisiológicas de espécies aquáticas em meio as flutuações de salinidade e temperatura do ambiente. Esta espécie de camarão Palaemonídeo poderá assim tornar-se uma ferramenta importante para avaliar os possíveis impactos consequentes da ação antrópica em diversos ecossistemas. Da mesma forma, a realização de estudos transgeracionais relacionados à nutrição de reprodutores e seus efeitos na prole possibilitam conhecer os impactos positivos e/ou negativos que as interações tróficas que ocorrem no meio podem acarretar ao ciclo de vida deste crustáceo e também, como as consequências destas interações afetam o desempenho das próximas gerações. Face ao curto intervalo de tempo entre gerações apresentado por esta espécie, assim como a facilidade da sua manutenção em cativeiro e produção (incluindo a fase larval), *P. varians* surge como uma espécie modelo bastante interessante para contribuir para o avanço do estado da arte nesta área de investigação, sobre a qual o conhecimento científico existente é ainda reduzido e essencialmente focado em organismos vertebrados.

## CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Veríssimo, S., Okada, E.K., 2004. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: Effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14, 11–19.
- Aguzzi, J., Cuesta, J. a., Librero, M., Toja, J., 2005. Daily and seasonal feeding rhythmicity of *Palaemonetes varians* (Leach 1814) from southwestern Europe. *Mar. Biol.* 148, 141–147.
- Alho, C.J.R., 2008. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian J. Boil.* 68, 957–966.
- Ammar, D., Müller, Y.M.R., Nazari, E.M., 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 18, 529–537.
- Anderson, J.L., 2002. Aquaculture and the future: why fisheries economists should care. *Mar. Resour. Econ.* 17, 133–151.
- Anger, K., 2001. The biology of decapod crustacean larvae. Taylor & Francis.
- Anger, K., 2003. Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebr. Reprod. Dev.* 43, 29–45.
- Anger, K., Dawirs, R.R., 1981. Laboratory experiments on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 34, 287–311.
- Anger, K., Hayd, L., 2009. From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquat. Biol.* 7, 19–30.
- Anger, K., Hayd, L., 2010. Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquat. Biol.* 9, 251–261.
- Anger, K., Hayd, L., Knott, J., Nettelmann, U., 2009. Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture* 287, 341–348.
- Anger, K., Storch, V., Anger, V., Capuzzo, J.M., 1985. Effects of starvation on oult cycle and hepatopancreas of stage 1 lobster (*Homarus americanus*) larvae. *Helgolander Meeresunters.* 39, 107–116.
- Ankeny, R.A., Leonelli, S., 2011. What's so special about model organisms? *Stud. Hist. Philos. Sci. Part A* 42, 313–323.
- Antheunisse, L.J., Lammens, J.J., Van Den Hoven, N.P., 1971. Diurnal activities and tidal migrations of the brackish water prawn *Palaemonetes varians* (Leach) (Decapoda, Caridea). *Crustaceana* 21, 203–217.
- Antheunisse, L.J., Van Den Hoven, N.P., 1968. The breeding characters of *Palaemonetes varians* (Leach) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 14, 259 – 270.
- Antonopoulou, E., Emson, R., 1988. The combined effects of temperature and salinity on survival, moulting and metamorphosis of the larval stages of the three species of Palaemonid prawns, in: *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms: Proc 23rd Eur Mar Biol Symp*, Swansea. p. 339–348.
- Antonopoulou, E., Emson, R.H., 1992. Aspects of the population dynamics of *Palaemonetes varians* (Leach), in: *Marine eutrophication and population dynamics: 25th European Marine Biology Symposium*. Ferrara, pp. 157–164.
- Araujo, M.C. De, Valenti, W.C., 2010. Efeito de baixas salinidades sobre larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Palaemonidae) submetidas à inanição. *Magistra* 22, 191–197.
- Arias, A.M., 2013. *Palaemonetes varians* (Leach, 1814) [WWW

Document]. URL <http://www.ictieterm.es>

Arts, M., Brett, M., Kainz, M., 2009. Lipids in aquatic ecosystems. Springer.

Asche, F., 2008. Farming the sea. Mar. Resour. Econ. 23, 527–547.

Barros, H., Valenti, W., 2003. Ingestion rates of *Artemia* nauplii for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 217, 223–233.

Bauer, R.T., 1991. Analysis of embryo production in a caridean shrimp guild from a tropical seagrass meadow, in: Werne, A., Kuris, A. (Eds.), Crustacean Egg Production. A. A. Balkema, pp. 181–192.

Beca-Carretero, P., Olesen, B., Marbà, N., Krause-Jensen, D., 2017. Response to experimental warming in northern eelgrass populations: comparison across a range of temperature adaptations. Mar. Ecol. Prog. Ser.

Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218, 491–499.

Bonaventura, R., Costa, C., Pinsino, A., Russo, R., Zito, F., Matranga, V., 2011. Echinoderms: model organisms for marine environmental monitoring and development of new emerging technologies, in: Marine Research at CNR: Fishery and Sea Resources. CNR, pp. 1967–1978.

Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R., 2010. Aquaculture: global status and trends. Phil. Trans. R. Soc. B 365, 2897–2912.

Bottino, N.R., Gennity, J., Lilly, M.L., Simmons, E., Finne, G., 1980. Seasonal and nutritional effects on the fatty acids of three species of shrimp, *Penaeus setiferus*, *P. aztecus* and *P. duorarum*. Aquaculture 19, 139–148.

Bouchon, D., 1991. Biological clock in seasonal reproductive cycle in the ditch shrimp *Palaemonetes varians* Leach. I. Photoperiodic time measurement. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 146, 1–12.

Bouquet, J.M., Spriet, E., Troedsson, C., Otter, H., Chourrout, D., Thompson, E.M., 2009. Culture optimization for the emergent zooplanktonic model organism *Oikopleura dioica*. J. Plankton Res. 31, 359–370.

Brett, M.T., Muller-Navarra, D.C., 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. Freshw. Biol. 38, 483–499.

Brown, J.H., New, M.B., Ismael, D., 2010. Biology, in: New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D'Abramo, L.R., Kutty, M.N. (Eds.), Freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, pp. 18–39.

Bulletin, M.P., Guih, F., Stazione, G., Anton, Z., Bernardeau-esteller, J., 2017. Effects of an experimental heat wave on fatty acid composition in two Mediterranean seagrass species. Mar. Pollut. Bull. 0–1.

Buss, D.F., Roque, F.D.O., Sonoda, K.C., Barroso, P., Junior, M., 2016. Macroinvertebrados Aquáticos como Bioindicadores no Processo de Licenciamento Ambiental no Brasil. Biodiversidade Bras. 6, 100–113.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295–311.

- Calado, R., 2008. Reproductive biology and mating behavior, in: Calado, R. (Ed.), Marine Ornamental shrimp biology, aquaculture and conservation. Wiley-Blackwell, pp. 37–44.
- Calado, R., 2017. Decapod Crustaceans, in: Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M.P., Holt, G.J. (Eds.), Marine ornamental species aquaculture. Wiley-Blackwell, pp. 475–495.
- Calado, R., Dionísio, G., Dinis, M.T., 2007a. Starvation resistance of early zoeal stages of marine ornamental shrimps *Lysmata* spp. (Decapoda: Hippolytidae) from different habitats. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 351, 226–233.
- Calado, R., Dionísio, G., Nunes, C., Dinis, M.T., 2007b. Facultative secondary lecithotrophy in the megalopa of the shrimp *Lysmata seticaudata* (Risso, 1816) (Decapoda: Hippolytidae) under laboratory conditions. J. Plankton Res. 29, 599–603.
- Calado, R., Pimentel, T., Cleary, D.F.R., Dionísio, G., Nunes, C., Lopes da Silva, T., Dinis, M.T., Reis, A., 2010a. Providing a common diet to different marine decapods does not standardize the fatty acid profiles of their larvae: a warning sign for experimentation using invertebrate larvae produced in captivity. Mar. Biol. 157, 2427–2434.
- Calado, R., Pimentel, T., Pochelon, P., Olaguer-Feliú, A.O., Queiroga, H., 2010b. Effect of food deprivation in late larval development and early benthic life of temperate marine coastal and estuarine caridean shrimp. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 384, 107–112.
- Calado, R., Pimentel, T., Vitorino, A., Dionísio, G., Dinis, M.T., 2008. Technical improvements of a rearing system for the culture of decapod crustacean larvae, with emphasis on marine ornamental species. Aquaculture 285, 264–269.
- Calado, R., Rosa, R., Morais, S., Nunes, M.L., Narciso, L., 2005a. Growth, survival, lipid and fatty acid profile of juvenile monaco shrimp *Lysmata seticaudata* fed on different diets. Aquac. Res. 36, 493–504.
- Calado, R., Rosa, R., Nunes, M.L., Narciso, L., 2005b. Amino and fatty acid dynamics of *Lysmata seticaudata* (Decapoda: Hippolytidae) embryos during early and late reproductive season. Mar. Biol. 147, 341–351.
- Calado, R., Vitorino, A., Dionísio, G., Dinis, M.T., 2007c. A recirculated maturation system for marine ornamental decapods. Aquaculture 263, 68–74.
- Calado, R., Vitorino, A., Reis, A., Da Silva, T., Dinis, M.T., 2009. Effect of different diets on larval production, quality and fatty acid profile of the marine ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* (de Man, 1888), using wild larvae as a standard. Aquac. Nutr. 15, 484–491.
- Callisto, M., Gonçalves Jr, J.F., 2005. Bioindicadores bentônicos, in: Roland, F., Cesar, D., Marinho, M. (Eds.), Lições de Limnologia. Rima, pp. 371–379.
- Cardoso, S.J., Roland, F., Loverde-Oliveira, S.M., Huszar, V.L. de M., 2012. Phytoplankton abundance, biomass and diversity within and between Pantanal wetland habitats. Limnologica 42, 235–241.
- Catella, A.C., Mascarenhas, R.D.O., Albuquerque, S.P., De Albuquerque, F.F., Theodoro, E.R.D.M., 2008. Sistemas de estatísticas pesqueiras no Pantanal, Brasil: Aspectos técnicos e políticos. Panam. J. Aquat. Sci. 3, 174–192.
- Cavalli, R.O., Berghe, E. Vanden, Lavens, P., Thuy, N.T.T., Wille, M., Sorgeloos, P., 2000. Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. Part C 125, 333–343.
- Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. Aquaculture 179, 387–402.



- Cervený, D., Turek, J., Grabic, R., Golovko, O., Koba, O., Fedorova, G., Grabicova, K., Zlabek, V., Randak, T., 2016. Young-of-the-year fish as a prospective bioindicator for aquatic environmental contamination monitoring. *Water Res.* 103, 334–342.
- Cesar, A., Pereira, C.D.S., A.R., S., Abessa, D.M.S., Fernández, N., Choueri, R.B., DaValls, T.A., 2006. Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system - Brazil. *Geographical* 54, 55–63.
- Charmantier, G., Anger, K., 2011. Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 396, 89–98.
- Chiarelli, R., Roccheri, M.C., 2014. Marine invertebrates as bioindicators of heavy metal pollution. *Open J. Met.* 4, 93–106.
- Christie, W.W., 1989. The preparation of derivatives of fatty acids, in: *gas chromatography and lipids: a practical guide*. Oily Press pp. 36–47.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R., Martin, J.L.M., 2001. Could a diet enriched with *n*-3 highly unsaturated fatty acids, be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress? *Aquac. Res.* 32, 91–94.
- Cho, C.Y., Cowey, C.B., Watanabe, T., 1986. *Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development*, Singapore, 155p.
- Choudhury, P.C., 1970. Complete Larval Development of the Palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), Reared in the Laboratory. *Crustaceana* 18, 113–132.
- Choudhury, P.C., 1971. Complete larval development of the palaemonid shrimp *Macrobrachium carcinus* (L.), reared in the laboratory. *Crustaceana* 20, 51–69.
- Christie, W.W., 1989. The preparation of derivatives of fatty acids, in: *gas chromatography and lipids a practical guide*. pp. 36–47.
- Coelho-Filho, P.A., Gonçalves, A.P., Barros, H.P., 2018. *Artemia* nauplii intake by *Macrobrachium carcinus* at different larval stages in laboratory. *Aquaculture* 484, 333–337.
- Cook, H.W., McMaster, C.R., 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes, in: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. pp. 181–204.
- Correia, M., Palma, J., Andrade, J.P., 2016. Growth performance of the early life stages of broad-nosed pipefish, *Syngnathus typhle* (L.) fed different live or frozen diets. *Aquac. Res.* 47, 1652–1660.
- Correia, M., Palma, J., Kirakowski, T., Andrade, J.P., 2008. Effects of prey nutritional quality on the growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* 39, 869–876.
- Corsino, J., 2009. *Bioquímica*. UFMS, 216p.
- Cottin, D., Brown, A., Oliphant, A., Mestre, N.C., Ravaux, J., Shillito, B., Thatje, S., 2012. Sustained hydrostatic pressure tolerance of the shallow water shrimp *Palaemonetes varians* at different temperatures: Insights into the colonisation of the deep sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 162, 357–363.
- Cottin, D., Shillito, B., Chertemps, T., Thatje, S., Léger, N., Ravaux, J., 2010. Comparison of

- heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 393, 9–16.
- Craig, S.R., Gardner, T.R., Carnevali, O., 2017. Growout and broodstock nutrition, in: Marine ornamental species: aquaculture. Wiley-Blackwell, pp. 139–158.
- D'Abramo, L.R., New, M.B., 2010. Nutrition, feeds and feeding, in: freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, pp. 219–238.
- Das, S.K., Tiwari, V.K., Venkateshwarlu, G., Reddy, a. K., Parhi, J., Sharma, P., Chettri, J.K., 2007. Growth, survival and fatty acid composition of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) post larvae fed HUFA-enriched *Moina micrura*. Aquaculture 269, 464–475.
- Das, U.N., 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. Biotechnol. J. 1, 420–439.
- Davidson, B.S., 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol. 6, 284–291.
- Dhont, J., MathieuWille, Frinsko, M., Coyle, S.D., Sorgeloos, P., 2010. Hatchery systems and management, in: freshwater prawns biology and farming. Blackwell, pp. 86–108.
- Ding, L., Fu, H., Hou, Y., Jin, M., Sun, P., Zhou, Q., 2017. Effects of starvation and feeding on blood chemistry, fatty acid composition and expression of vitellogenin and fatty acid-binding protein genes in female swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock. Fish. Sci. 83, 455–464.
- Dolmen, D., 1997. *Palaemonetes varians* (Leach) (Crustacea, Decapoda, Natantia) in Norway. Sarsia 82, 19–21.
- Dolmen, D., Hindley, J., Kleiven, E., 2004. Distribution of *Palaemonetes varians* (Leach) (Crustacea, Decapoda) in relation to biotope and other caridean shrimps in brackish waters of southern Norway and southwestern Sweden. Sarsia 89, 8–21.
- Dos Santos, A., Hayd, L., Anger, K., 2013. A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. Zootaxa 4, 534–546.
- Dowhan, W., Bogdanov, M., Mileyskovskaya, E., 2008. Functional roles of lipids in membranes, in: biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. pp. 2–38.
- Escaravage, V., Castel, J., 1990. The impact of the lagoonal shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) on meiofauna in a temperate coastal impoundment. Acta Oecologica 11, 409–418.
- Espinoza, C., Guzmán, F., Bascur, M., Urzúa, Á., 2016. Effect of starvation on the nutritional condition of early zoea larvae of the red squat lobster *Pleuroncodes monodon* (Decapoda, Munididae). Invertebr. Reprod. Dev. 60, 152–160.
- Falciai, L., 2001. Occurrence of *Palaemonetes Varians* (Leach, 1814) (Decapoda, Palaemonidae) in a Brackish Pond in Algeria. Crustaceana 74, 697–701.
- FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO, 2017. World aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015: a brief overview. FAO.
- Fincham, A.A., 1979. Larval development of British prawns and shrimps (Crustacea, Decapoda, Natantia). 2. *Palaemonetes* (*Palaemonetes*) *variens* (Leach, 1814) and morphological variation. Bull. Br. Museum Nat. Hist. 35, 163–182.

- Frolov, A. V., Pankov, S.L., Geradze, K.N., Pankova, S.A., 1991. Influence of salinity on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). aspects of adaptation A. Camp. Biochem. Physiol 99, 541–550.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Ecosystem management bioindicators: The ECOMAN project - A multi-biomarker approach to ecosystem management. Mar. Environ. Res. 58, 233–237.
- Gastelú, J.C., Oliveira, J., Brito, L.O., Galvez, A.O., Moreira, M.G., 2011. Efeito da temperatura e dos alimentos protéico e estágios de muda do *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836). Ciência Anim. Bras. 12, 443–455.
- Gelin, A., Souty-Grosset, C., 2006. Species identification and ecological study of the genus *Palaemonetes* (Decapoda: Caridea) in the French Mediterranean. J. Crust. Biol. 26, 124–133.
- Giménez, L., 2006. Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapod crustaceans. Integr. Comp. Biol. 46, 615–622.
- Giménez, L., 2010. Relationships between habitat conditions, larval traits, and juvenile performance in a marine invertebrate. Ecology 91, 1401–1413.
- Giménez, L., Anger, K., 2001. Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* dana, 1851. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 260, 241–257.
- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. Rev. Aquac. 1, 71–124.
- Gomes, L.C., Agostinho, A.A., 1997. Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curimba, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, in upper Parana River, Brazil. Fish. Manag. Ecol. 4, 263–274.
- González-Félix, M.L., Gatlin, D.M., Lawrence, A.L., Perez-Velazquez, M., 2002. Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. 33, 330–340.
- González-Ortegón, E., Cuesta, J.A., 2006. An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. J. Mar. Biol. Assoc. UK 86, 93.
- González-Ortegón, E., Pascual, E., Cuesta, J. a., Drake, P., 2006. Field distribution and osmoregulatory capacity of shrimps in a temperate European estuary (SW Spain). Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 293–302.
- González-Ortegón, E., Pascual, E., Drake, P., 2013. Respiratory responses to salinity, temperature and hypoxia of six caridean shrimps from different aquatic habitats. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 445, 108–115.
- González-Ortegón, E., Rodríguez, A., Drake, P., 2012. The freshwater shrimp *Atyaephyra desmarestii* (Millet, 1831) as a bioindicator of hypoxic event effects on temperate freshwater systems. Ecol. Indic. 18, 236–242.
- Graeve, M., Wehrtmann, I., 2003. Lipid and fatty acid composition of Antarctic shrimp eggs (Decapoda: Caridea). Polar Biol. 26, 55–61.
- Gray, J.S., 1992. Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. Mar. Pollut. Bull. 25, 48–50.
- Grealis, E., Hynes, S., O'Donoghue, C., Vega, A., Van Osch, S., Twomey, C., 2017. The economic impact of aquaculture expansion: an input-output approach. Mar. Policy 81, 29–36.

- Guary, J.C., Kayama, M., Murakami, Y., 1975. Variations saisonnières de la composition en acides gras chez *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol. 29, 335–341.
- Guary, J.C., Kayama, M., Murakami, Y., Ceccaldi, H.J., 1976. The effects of a fat-free diet and compounded diets supplemented with various oils on moult, growth and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture 7, 245–254.
- Gurney, R., 1923. Some Notes on *Leander longirostris* M. Edwards, and other British Prawns. Proc. Zool. Soc. 116, 97–123.
- Hampel, H., Cattrijsse, A., Mees, J., 2004. Changes in marsh nekton communities along the salinity gradient of the Schelde river, Belgium and The Netherlands. Hydrobiologia 515, 137–146.
- Hamza-Chaffai, A., 2014. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. Int. J. Biotechnol. Wellness Ind. 3, 19–26.
- Hannesson, R., 2003. Aquaculture and fisheries. Mar. Policy 27, 169–178.
- Harrison, K.E., 1990. The role nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. J. Shellfish Res. 9, 1–28.
- Hayd, L., Anger, K., 2013. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. Rev. Biol. Trop. 61, 39–57.
- Hayd, L.A., Anger, K., Valenti, W.C., 2008. The moulting cycle of larval Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* reared in the laboratory. Nauplius 16, 55–63.
- Hayd, L.A.H., Anger, K., Urzua, A., 2017. Growth, elemental and proximate biochemical composition of larval Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*, reared under different salinity conditions. Lat. Am. J. Aquat. Res. 45, 983–991.
- Hindley, J., 2011. The ecology and dynamics of the brackish water prawn, *Palaemonetes varians* (Leach) and its interrelationship with the common goby, *Pomatoschistus microps* (Krøyer) in artificial coastal lagoons of the Ribble Estuary, Lancashire. University of Lancaster.
- Holthuis, L.B., 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. ii. The subfamily Palaemoninae. The University of Southern California.
- Holthuis, L.B., 1978. Decapoda. In: Illies J, editor. Limnofauna Europaea. Stuttgart: Gustav Fischer. 231–233., in: Illies, J. (Ed.), Limnofauna Europaea. Stuttgart: Gustav Fischer, pp. 231–233.
- Holthuis, L.B., Ng, P.K.L., 2010. Nomenclature and taxonomy, in: freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, pp. 12–17.
- Ismael, D., New, M.B., 2000. Biology, in: freshwater prawn culture the farming of *Macrobrachium Rosenbergii*. Blackweel Publishing, pp. 18–40.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture 197, 25–42.
- Johnson, R.K., Wiederholm, T., Rosenberg, D.M., 1993. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates., in: Rosenberg, D.M., Resh, V.H. (Eds.), Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Chapman & Hall, pp. 40–125.
- Johnston, D.J., Ritar, A.J., Thomas, C.W., 2004. Digestive enzyme profiles reveal digestive capacity and potential energy sources in fed and starved spiny lobster (*Jasus edwardsii*)

- phyllosoma larvae. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 138, 137–144.
- Junk, W.J., Da Cunha, C.N., Wantzen, K.M., Petermann, P., Strüssmann, C., Marques, M.I., Adis, J., 2006. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquat. Sci.* 68, 278–309.
- Junk, W.J., Piedade, M.T.F., Lourival, R., Wittmann, F., Kandus, P., Lacerda, L.D., Bozelli, R.L., Esteves, F.A., Nunes da Cunha, C., Maltchik, L., Schöngart, J., Schaeffer-Novelli, Y., Agostinho, A.A., 2014. Brazilian wetlands: Their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 24, 5–22.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B, 295–298.
- Karim, H.M., De Freitas, J.E.C., Carvalho, T.P.D., Nascimento, M.S., Hayd, L.A., 2015. Viabilidade econômica da produção do Camarão-do-Pantanal (*Macrobrachium pantanalense*). *Bol. do Inst. Pesca* 41, 103–112.
- Kattner, G., Graeve, M., Calcagno, J.A., Lovrich, G.A., Thatje, S., Anger, K., 2003. Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 292, 61–74.
- Kelly, J.R., Scheibling, R.E., 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 1–22.
- Knie, J.L., Lopes, E.W.B., 2004. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. *Fatma/gtz*.
- Kutty, M.N., Valenti, W.C., 2010. Culture of other freshwater prawns species, in: *freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, pp. 502–523.
- Lal, M.M., Seeto, J., Pickering, T.D., Hodge, S., 2012. Salinity and temperature requirements for larviculture of the Monkey River prawn *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798) (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). *Aquaculture* 366–367, 1–8.
- Leal, M.C., Madeira, C., Brandão, C.A., Puga, J., Calado, R., 2012. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products - A chemical and zoogeographical perspective. *Molecules* 17, 9842–9854.
- Leal, M.C., Rocha, R.J.M., Rosa, R., Calado, R., 2016a. Aquaculture of marine non-food organisms: What, why and how? *Rev. Aquac.* 1–24.
- Leal, M.C., Vaz, M.C.M., Puga, J.J., Rocha, R.J.M., Brown, C., Rosa, R., Calado, R., 2016b. Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. *Fish Fish.* 17, 459–468.
- Lejeusne, C., Latchere, O., Petit, N., Rico, C., Green, A.J., 2013. Do invaders always perform better? Comparing the response of native and invasive shrimps to temperature and salinity gradients in south-west Spain. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 136, 102–111.
- Leonelli, S., Ankeny, R.A., 2013. What makes a model organism? *Endeavour* 37, 209–212.
- Lima, R.B., Figueiredo-Lima, D.F., 2016. Critical Review: Essential fatty acids on shrimp feeding. *Sci. Agrar. Parana.* 15, 236–243.
- Lofts, B., 1956. The effects of salinity changes on the respiratory rate of the prawn *Palaemonetes varians* (Leach). *J. Exp. Biol.* 33, 730–736.
- Lourival, R., Harris, M., Montambault, J.R., 2000. Introduction to the Pantanal, Mato Grosso

do Sul, Brasil, in: a biological assessment of the aquatic ecosystems of the pantanal, Mato Grosso Do Sul, Brasil. pp. 28–33.

Lucas, J.S., Southgate, P.C., 2012. Aquaculture: farming aquatic animals and plants. Wiley-Blackwell. 645p.

Macedo, D.R., Ligeiro, R., Ferreira, W.R., Junqueira, N.T., Sanches, B.O., Silva, D.R.O., Alves, C.B.M., Hughes, R.M., Kaufmann, P.R., Pompeu, P.S., Santos, G.B., Callisto, M., 2012. Parâmetros biológicos e de habitats físicos para a avaliação de bacias no sudeste do Brasil. *Ação Ambient.* 13, 15–18.

Maciel, C.R., New, M.B., Valenti, W.C., 2012. The predation of *Artemia* nauplii by the larvae of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), is affected by prey density, time of day, and ontogenic development. *J. World.* 43, 659–669.

Maciel, C.R., Valenti, W.C., 2009. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius* 17, 61–79.

Magalhães, C., 2000. Diversity and abundance of decapod crustaceans in the rio Negro basin, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, in: a biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso Do Sul. *Rap bulletin of biological assessment* eighteen, pp. 56–62.

Magalhães, D.D.P., Ferrão Filho, A. da S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Bras.* 12, 355–381.

Magozzi, S., Calosi, P., 2015. Integrating metabolic performance, thermal tolerance, and plasticity enables for more accurate predictions on species vulnerability to acute and chronic effects of global warming. *Glob. Chang. Biol.* 21, 181–194.

Malloy, K.J., Wade, D., Janicki, A., Grabe, S.A., Nijbroek, R., 2007. Development of a benthic index to assess sediment quality in the Tampa Bay Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 22–31.

Matthews, R.A., Buikema, A.L., Cairns, J., Rodgers, J.H., 1982. Biological monitoring part IIA- Receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Res.* 16, 129–139.

Meireles, A.L., Valenti, W.C., Mantelatto, F.L., 2013. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41, 718–731.

Mendes, A.I.C., 2008. Influência da dieta parental na qualidade lipídica dos ovos e no desenvolvimento embrionário de camarinha, *Palaemonetes varians*. Universidade do Algarve.

Moraes-Valenti, P., de Moraes, P., de Lima Preto, B., Valenti, W., 2010. Effect of density on population development in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquat. Biol.* 9, 291–301.

Moraes-Valenti, P.M.C., Valenti, W.C., 2010. Culture of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*, in: freshwater prawns: biology and farming. Wiley-Blackwell, pp. 485–501.

Moraes, S., Narciso, L., Calado, R., 2002. Development of *Plesionika mania* (Decapoda; Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda; Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242, 195–204.

Moreira, G.S., McNamara, J.C., Moreira, P.S., 1982. The effect of salinity on the metabolic rates of some palaemonid shrimp larvae. *Aquaculture* 29, 95–100.

- Morris, J.P., Thatje, S., Cottin, D., Oliphant, A., Brown, A., Shillito, B., Ravaux, J., Hauton, C., 2015. The potential for climate-driven bathymetric range shifts: sustained temperature and pressure exposures on a marine ectotherm, *Palaemonetes varians*. *R. Soc. Open Sci.* 2.
- Morris, R.J., Lockwood, A.P.M., Dawson, M.E., 1982. An effect of acclimation salinity on the fatty acid composition of the gill phospholipids and water flux on the amphipod crustacean *Gammarus duebeni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 497–503.
- Mossolin, E.C., Bueno, S.L.S., 2002. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. *J. Crustac. Biol.* 22, 367–376.
- Müller, Y., Ammar, D., Nazari, E., 2004. Embryonic development of four species of Palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Rev. Bras. Zool.* 21, 27–32.
- Muriana, F.J., Ruiz-Gutierrez, V., Bolufer, J., 1904. Phospholipid fatty acid compositions of hepatopancreas and muscle from the prawn, *Penaeus japonicus*. *J. Biochem.*, Tokyo 1993 Vol. 114, No. 3, 114, 404–407.
- Nates, S., McKenney, C., 2000. Ontogenetic changes in biochemical composition during laral and early postlarval development of *Lepidophthalmus louisianensis*, a ghost shrimp with abbreviated development. *Comp. Biochem. Physiol.* 127, 459–468.
- Nazari, E.M., Rauh Müller, Y.M., Ammar, D., 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Decapoda, Palaemonide), reared in the laboratory. *Crustaceana* 73, 143–152.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6th ed. Artmed. 896p.
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Gonçalves, F., Gonçalves, A.M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230.
- New, P., Brown, A., Oliphant, A., Burchell, P., Smith, A., Thatje, S., 2014. The effects of temperature and pressure acclimation on the temperature and pressure tolerance of the shallow-water shrimp *Palaemonetes varians*. *Mar. Biol.* 161, 697–709.
- Newman, M.C., Clements, W.H., 2008. *Ecotoxicology a comprehensive treatment*. 882p.
- Nieto, E., Hampel, M., González-Ortegón, E., Drake, P., Blasco, J., 2016. Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. desmarestii*. *J. Hazard. Mater.* 313, 159–169.
- Oliphant, A., 2013. Decapod crustacean larval developmental plasticity and the evolution of lecithotrophy and abbreviated development 1–211p.
- Oliphant, A., Hauton, C., Thatje, S., 2013. The implications of temperature-mediated plasticity in larval instar number for development within a marine invertebrate, the shrimp *Palaemonetes varians*. *PLoS One* 8.
- Oliphant, A., Ichino, M.C., Thatje, S., 2014. The influence of per offspring investment (POI) and starvation on larval developmental plasticity within the Palaemonid shrimp, *Palaemonetes varians*. *Mar. Biol.* 161, 2069–2077. Oliphant, A., Thatje, S., 2014. Energetic adaptations to larval export within the brackish-water palaemonine shrimp, *Palaemonetes varians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 505, 177–191.
- Oliphant, A., Thatje, S., Brown, A., Morini, M., Ravaux, J., Shillito, B., 2011. Pressure tolerance of the shallow-water caridean shrimp *Palaemonetes varians* across its thermal

tolerance window. J. Exp. Biol. 214, 1109–1117.

Olivotto, I., Oliver, M.P., Turchi, C., 2017. Larval diets and nutrition, in: Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M.P., Holt, G.J. (Eds.), Marine ornamental species: aquaculture. Wiley-Blackwell, pp. 125–138.

Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. J. World Aquac. Soc. 42, 135–166.

Ottinger, M., Clauss, K., Kuenzer, C., 2016. Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments - a review. Ocean Coast. Manag. 119, 244–266.

Palma, J., Andrade, J.P., Bureau, D.P., 2012. Growth, reproductive performances, and brood quality of long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*, fed enriched shrimp diets. J. World Aquac. Soc. 43, 802–813.

Palma, J., Andrade, J.P., Lemme, A., Bureau, D.P., 2015. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* for lysine, methionine and arginine. Aquac. Res. 46, 1822–1830.

Palma, J., Bureau, D.P., Andrade, J.P., 2008. Effects of binder type and binder addition on the growth of juvenile *Palaemonetes varians* and *Palaemon elegans* (Crustacea: Palaemonidae). Aquac. Int. 16, 427–436.

Palma, J., Bureau, D.P., Correia, M., Andrade, J.P., 2009. Effects of temperature, density and early weaning on the survival and growth of Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* larvae. Aquac. Res. 40, 1468–1473.

Palma, J., Stockdale, J., Correia, M., Andrade, J.P., 2008. Growth and survival of adult long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) using frozen diets. Aquaculture 278, 55–59.

Pantaleão, J.A.F., Hirose, G.L., Costa, R.C., 2014. Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. Braz. J. Biol. 74, 223–232.

Pavlaki, M.D., Araújo, M.J., Cardoso, D.N., Silva, A.R.R.S., Cruz, A., Mendo, S., Soares, M.V.M., Calado, R., Loureiro, S., 2016. Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. Environ. Pollut. 215, 203–212.

Pechenik, J.A., 2006. Larval experience and latent effects - Metamorphosis is not a new beginning. Integr. Comp. Biol. 46, 323–333.

Pechenik, J.A., Wendt, D.E., Jarrett, J.N., 1998. Metamorphosis is not a new beginning: larval experience influences juvenile performance. Bioscience 48, 901–910.

Pillay, T.V.R., Kutty, M.N., 2005. Aquaculture principles and practices, 2nd ed. Blackwell Publishing. 640p.

Pinheiro, M.A.A., Hebling, N.J., 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), in: Valenti, W.C. (Ed.), Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia Para a Produção de Camarões. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, pp. 21–46.

Pomponi, S.A., 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. Prog. Ind. Microbiol. 35, 5–13.

Pontes, S.C., Andreatta, E.R., 2003. Efeito da oferta de náuplios de *Artemia franciscana* enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre o desenvolvimento de pós-larvas do camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*. Rev. Bras. Zootec. 32, 1544–1550.



- Prabhakaran, K., Nagarajan, R., Merlin Franco, F., Anand Kumar, A., 2017. Biomonitoring of Malaysian aquatic environments: a review of status and prospects. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 17, 134–147.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227, 107–130.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 183–192.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507.
- Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2013. Accumulation and detoxification of copper and zinc by the decapod crustacean *Palaemonetes varians* from diets of field-contaminated polychaetes *Nereis diversicolor*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 449, 312–320.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1995. The significance of lipids at early stage of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103–115.
- Raveux, J., Leger, N., Rabet, N., Morini, M., Zbinden, M., Thatje, S., Shillito, B., 2012a. Adaptation to thermally variable environments: capacity for acclimation of thermal limit and heat shock response in the shrimp *Palaemonetes varians*. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 899–907.
- Rey, F., Calado, R., 2016. A influência dos efeitos maternos em invertebrados bentônicos marinhos com ciclos de vida bifásicos, com ênfase nos crustáceos decápodes. *Captar* 6, 1–10.
- Rey, F., Domingues, M.R.M., Domingues, P., Rosa, R., Orgaz, M.D.M., Queiroga, H., Calado, R., 2017. Effect of maternal size, reproductive season and interannual variability in offspring provisioning of *Carcinus maenas* in a Coastal Lagoon. *Estuaries and Coasts* 1–12.
- Ribas, L., Piferrer, F., 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev. Aquac.* 6, 209–240.
- Ribeiro, K., Franceschini-Vicentini, I.B., Papa, L.P., New, M.B., Valenti, W.C., 2012. Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Aquac. Res.* 43, 1756–1763.
- Ricardo, F., Pimentel, T., Maciel, E., Moreira, A.S.P., Rosário Domingues, M., Calado, R., 2017. Fatty acid dynamics of the adductor muscle of live cockles (*Cerastoderma edule*) during their shelf-life and its relevance for traceability of geographic origin. *Food Control* 77, 192–198.
- Ricardo, F., Pimentel, T., Moreira, A.S.P., Rey, F., Coimbra, M.A., Rosário Domingues, M., Domingues, P., Costa Leal, M., Calado, R., 2015. Potential use of fatty acid profiles of the adductor muscle of cockles (*Cerastoderma edule*) for traceability of collection site. *Sci. Rep.* 5, 1–8.
- Ricardo, F.F.A., 2017. Utilização de ferramentas biogeoquímicas na rastreabilidade de origem de bivalves – primeiros passos para a certificação de origem. Universidade de Aveiro.
- Roberts, G.M., 1995. Salt-marsh Crustaceans, *Gammarus duebeni* and *Palaemonetes varians* as predators of mosquito larvae and their reaction to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 5, 379–386.
- Rodrigues, E.T., Pardal, M.Â., 2014. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environ. Int.* 70, 158–182.
- Rodríguez, F., Barroso, F.J., Galindo, M.D., 1993. Estudio biométrico y morfológico de los

- huevos de *Palaemonetes varzans* Leach de dos localidades del Suroeste Español. *Limnética* 9, 67–72.
- Romano, N., Safee, M.A., Ebrahimi, M., Arshad, A., 2016. Fatty acid compositional changes during the embryonic development of the swimming crab, *Portunus pelagicus* (Portunidae: Decapoda). *Invertebr. Reprod. Dev.* 60, 112–117.
- Romano, N., Zeng, C., 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: Implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* 334–337, 12–23.
- Rosa, R., Calado, R., Andrade, a. M., Narciso, L., Nunes, M.L., 2005. Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 140, 241–249.
- Rosa, R., Calado, R., Narciso, L., Nunes, M.L., 2007. Embryogenesis of decapod crustaceans with different life history traits, feeding ecologies and habitats: a fatty acid approach. *Mar. Biol.* 151, 935–947.
- Rosa, R., Morais, S., Calado, R., Narciso, L., Nunes, M.L., 2003. Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquaculture* 221, 507–522.
- Rosa, R., Nunes, M., 2002. Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. *Mar. Biol.* 141, 1001–1009.
- Rosenberg, D.M., Wiens, A.P., 1976. Community and species responses of *Chironomidae* (Diptera) to contamination of fresh waters by crude oil and petroleum products, with special reference to the Trail River, Northwest Territories. *J. Fish. Res. Board Canada* 33, 1955–1963.
- Ruppert, E., Barnes, R., 1993. Crustáceos, in: *zoología dos invertebrados*. Roca, pp. 659–777.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G., 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 241–249.
- Sany, S.B.T., Hashim, R., Rezayi, M., Salleh, A., Safari, O., 2014. A review of strategies to monitor water and sediment quality for a sustainability assessment of marine environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 813–833.
- Schöne, B.R., Krause, R.A., 2016. Retrospective environmental biomonitoring – mussel watch expanded. *Glob. Planet. Change* 144, 228–251.
- Schröder, M., Sondermann, M., Sures, B., Hering, D., 2015. Effects of salinity gradients on benthic invertebrate and diatom communities in a German lowland river. *Ecol. Indic.* 57, 236–248.
- Segner, H., Baumann, L., 2016. What constitutes a model organism in ecotoxicology? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 12, 591.
- Sicuro, B., 2017. Nutrition in ornamental aquaculture: the raise of anthropocentrism in aquaculture? *Rev. Aquac.* 1–9.
- Silio-Calzada, A., Barquín, J., Huszar, V.L.M., Mazzeo, N., Méndez, F., Álvarez-Martínez, J.M., 2017. Long-term dynamics of a floodplain shallow lake in the Pantanal wetland: Is it all about climate? *Sci. Total Environ.* 605–606, 527–540.
- Silva, S. De, Turchini, G., Francis, D., 2002. Nutrition, in: *aquaculture: farming aquatic*

animals and plants. pp. 164–187.

Soares, M.P., Jesus, F., Almeida, A.R., Zlabek, V., Grabic, R., Domingues, I., Hayd, L., 2017. Endemic shrimp *Macrobrachium pantanalense* as a test species to assess potential contamination by pesticides in Pantanal (Brazil). *Chemosphere* 168, 1082–1092.

Sollaud, E., 1923. Recherches sur l'embryogénie des crustacés décapodes, de la sous-famille des "Palaemoninae".. *Bull. biol. Fr. Belg* 5, 1–234.

Sorgeloos, P., Léger, P., 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquac. Soc.* 23, 251–264.

Sorte, C.J.B., Pandori, L.L.M., Cai, S., Davis, K.A., 2018. Predicting persistence in benthic marine species with complex life cycles: linking dispersal dynamics to redistribution potential and thermal tolerance limits. *Mar. Biol.* 162:20, 1-12

Souza, A.S., Paula, G.D., Simith, D. de J. de B., Abrunhosa, F.A.,, 2017. Effects of temporary starvation and feeding on the survival and developmental time to metamorphosis in megalopa larvae of two Neotropical mangrove crab species, genus *Sesarma* (Sesarmidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 497, 134–142.

Støttrup, J.G., McEvoy, L.A., 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Inc. 337p.

Stumpf, L., Calvo, N.S., Pietrokovsky, S., López Greco, L.S., 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 304, 34–41.

Sykes, A. V., Domingues, P.M., Andrade, J.P., 2006. Effects of using live grass shrimp (*Palaemonetes varians*) as the only source of food for the culture of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquac. Int.* 14, 551–568.

Tacon, A.G., 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp: a training manual. the essential nutrients. Ao trust fund gcp/rla/075/ita, Brasilia.117p.

Thomas, C.D., Thomas, C.D., Cameron, A., Cameron, A., Green, R.E., Green, R.E., Bakkenes, M., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., Erasmus, B.F.N., De Siqueira, M.F., De Siqueira, M.F., Grainger, A., Grainger, A., Hannah, L., Hannah, L., Hughes, L., Hughes, L., Huntley, B., Huntley, B., Van Jaarsveld, A.S., Van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Midgley, G.F., Miles, L., Miles, L., Ortega-Huerta, M. a, Ortega-Huerta, M. a, Peterson, a T., Peterson, a T., Phillips, O.L., Phillips, O.L., Williams, S.E., Williams, S.E., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145–8.

Thornton, P.K., Ericksen, P.J., Herrero, M., Challinor, A.J., 2014. Climate variability and vulnerability to climate change: A review. *Glob. Chang. Biol.* 20, 3313–3328.

Trusty, M.F., Goldstein, J.S., Fiore, D.R., 2005. Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. *Aquac. Nutr.* 11, 191–198.

Tropea, C., Stumpf, L., López Greco, L.S., 2015. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda* (Decapoda, Caridea). *PLoS One* 10.

Turner, N., Else, P.L., Hulbert, A.J., 2003. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: Implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90, 521–523.

- Uno, Y., Kwon, C.S., 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) reared in the laboratory. J. Tokyo Univ. Fish. 55, 179–190.
- Urzúa, Á., Anger, K., 2011. Larval biomass and chemical composition at hatching in two geographically isolated clades of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*: intra- or interspecific variation? Invertebr. Reprod. Dev. 55, 236–246.
- Valenti, W.C., Hayd, L.D.A., Vetorelli, M.P., Martins, M.I.E.G., 2011. Economic analysis of Amazon river prawn farming to the markets for live bait and juveniles in Pantanal, Brazil. Bol. do Inst. Pesca 37, 165–176.
- Valenti, W.C., Hayd, L.D.A., Vetorelli, M.P., Martins, M.I.E.G., 2008. Viabilidade econômica da produção de iscas e juvenis de *Macrobrachium amazonicum* no Pantanal, in: Cyrino, J.E., Scorvo Filho, J.D., Sampaio, L.A., Cavalli, R.O. (Eds.), Tópicos Especiais Em Biologia Aquática E Aquicultura II. Jaboticabal, pp. 25–25.
- Vega Pérez, L.A., 1984. Desenvolvimento larval de *Macrobrachium heterochirus* (Wiegmann, 1839), *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), em laboratório.
- Vercesi, K., Hayd, L., 2015. Avaliação do número de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium pantanalense*. Bol. do Inst. Pesca 41, 655–663.
- Vitorino, H.A., Pastrana, R.Y.A., Pastrana, E.C.A., Ortega, P., 2017. Hepatopancreatic cells of a stone crab *Menippe frontalis* from Perú: separation, viability study, and evaluation of lipoperoxidation against cadmium contamination. Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim. 1–4.
- Wang, L., Fan, Y., Yan, C., Gao, C., Xu, Z., Liu, X., 2017. Assessing benthic ecological impacts of bottom aquaculture using macrofaunal assemblages. Mar. Pollut. Bull. 114, 258–268.
- Washington, H.G., 1984. Diversity, biotic and similarity indices. a review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Res. 18, 653–694.
- Watanabe, T., Vassallo-Agius, R., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. Aquaculture 227, 35–61.
- Webster, C.D., Lin, C., 2002. Introduction to fish nutrition, in: Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. p. 1-27.
- Weiss, R., Klaus, A., Hayd, L., Schubart, C.D., 2015. Interpreting genetic distances for species recognition: the case of *Macrobrachium amazonicum* and the recently described *M. pantanalense* (Decapoda, Palaemonidae) from Brazilian freshwaters. Crustaceana 88, 1111–1126. .
- WoRMS, W.R. of M.S., 2018a. *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 [WWW Document]. URL <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=156892>
- WoRMS, W.R. of M.S., 2018b. *Macrobrachium pantanalense* Dos Santos, Hayd & Anger, 2013. [WWW Document]. URL <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=763008> on 2018-02-15
- WoRMS, W.R. of M.S., 2018c. *Palaemon varians* Leach, 1813 [in Leach, 1813-1814] [WWW Document]. URL <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=587704> on 2018-02-15
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J., 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation.

Aquaculture 198, 307–323.

Wu, L., Dong, S., Wang, F., Tian, X., Ma, S., 2001. the effect of previous feeding regimes on the compensatory growth response in chinese shrimp , *Fenneropenaeus chinensis* in the natural environment , individ- nutritional stress . A. J. Crustac. Biol. 21, 559–565.

Yao, J., Zhao, Y., Wang, Q., Zhou, Z., Hu, X., Duan, X., An, C., 2006. Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 253, 573–582.

Yúfera, M., Rodríguez, A., 1985. Tasas de alimentación y crecimiento de *Palaemonetes varians* (Crustacea: Palaemonidae) durante el desarrollo larvario. Inv. Pesq. 49:4, 597-606.

Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2014. Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações. Rima, São Carlos.472p.

Zhang, C., Li, Z., Li, F., Xiang, J., 2014. Effects of starvation on survival, growth and development of *Exopalaemon carinicauda* larvae. Aquac. Res. 1-11.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Anal. Chim. Acta 606, 135–150.

Zupo, V., Maibam, C., Fink, P., von Elert, E., 2015. Effect of storage on the fatty acid content of foods for post-larvae of the crustacean decapod *Hippolyte inermis*. Invertebr. Reprod. Dev. 1–10.